



Victor Gomes Lauriano de Souza

Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos

Desenvolvimento de bio-nanocompósitos de quitosano / montmorilonite incorporados com extratos naturais como embalagens ativas para alimentos

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em
Qualidade Alimentar

Orientadora: Prof. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando, Professora Auxiliar, FCT/UNL

Coorientadoras: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,
Professora Auxiliar, FCT/UNL
Prof. Doutora Isabel Maria Rôla Coelho,
Professora Auxiliar com Agregação, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Maria Rosa Santos de Paiva (FCT/UNL)

Arguentes: Prof. Doutora Silvina dos Anjos Pimenta Marques Maia Ferro Palma (ESA/IPBeja)

Prof. Doutora Ana Teresa Sanches Silva (INIAV, I.P.)

Vogais: Prof. Doutor Francisco Manuel Braz Fernandes (FCT/UNL)

Prof. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando (FCT/UNL)



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Maio 2018

Victor Gomes Lauriano de Souza

Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos

**Desenvolvimento de bio-nanocompósitos de quitosano
/ montmorilonite incorporados com extratos naturais
como embalagens ativas para alimentos**

Orientadora: Prof. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando,
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Coorientadoras: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Prof. Doutora Isabel Maria Rôla Coelho,
Professora Auxiliar com Agregação, FCT/UNL



Maio, 2018

“Desenvolvimento de bio-nanocompósitos de quitosano/montmorilonite incorporados com extratos naturais como embalagens ativas para alimentos” Copyright © Victor Gomes Lauriano de Souza, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Aos meus queridos pais dedico...

Agradecimentos

A Deus por sempre estar presente me guiando ao longo do meu caminho.

À Universidade Nova de Lisboa, por meio do Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa da Faculdade de Ciências e Tecnologia, pela oportunidade de participação no Programa Doutoral em Qualidade Alimentar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Brasil) por meio do programa Federal “Ciências sem Fronteiras”, pela concessão da bolsa de estudos.

À Professora Doutora Ana Luísa Fernando, pela confiança depositada em mim mesmo sem conhecer-me, e posteriormente por todas as oportunidades acadêmicas a mim oferecidas e orientações. Tenho a Professora como um modelo a ser seguido e sinto-me honrado em ter sido seu orientado.

À Professora Doutora Maria Paula Duarte, pelos aconselhamentos, contributos na escrita e execução das análises microbiológicas, e claro, no papel de coorientadora desempenhado impecavelmente.

À Professora Doutora Isabel Maria Rôla Coelho, pela oportunidade de realizar consigo as análises de determinação das permeabilidades aos gases e ao vapor de água. Agradeço também à professora pelo papel fundamental como coorientadora.

À Professora Doutora Benilde Simões como Presidente do Departamento e responsável pelo Programa Doutoral por toda sabedoria, experiência e conhecimento compartilhados.

Ao Professor Doutor Francisco Braz Fernandes pelos sábios conselhos e orientações.

À Dona Lurdes (minha mãe portuguesa) por sempre facilitar nossas vidas dentro do DCTB/FCT, e claro por todas as conversas e valiosos conselhos durante estes 4 anos.

À Dona Rita e Dona Rosa nossos Anjos do Laboratório 145, pela preciosa ajuda e pelos momentos de descontração que também fazem parte do percurso.

Aos demais professores do DCTB, Professor Doutor Nuno Lapa, Professora Doutora Margarida Gonçalves e Professora Doutora Ana Lúcia Leitão, pelos ensinamentos prestados.

Aos meus familiares pelo grande apoio e incentivo, em especial aos meus pais, Ferreira e Romilda, meu irmão Igo, sobrinha Priscilla e primas Carol, Elisa e Alda.

Às colegas de doutoramento, Liliana, Ana Lúcia, Catarina Nobre, Catarina Viegas, Ricardo, Celso, Diogo Dias, Delfina, João Muniz e Ana Sofia pelos momentos de convívio e de estudo.

Aos preciosos amigos que Portugal trouxe-me: Manu, Marcella, Gabriel, Beatriz, Xana, Katelene, Fernanda, Karliana e Alessandra, pela convivência e pela enorme ajuda ao longo de todas as etapas da realização desta empreitada. Tenho-vos como irmãos!

Aos amigos que de longe sempre me acompanharam e torceram pelo meu sucesso: Denise, Mila, Jussara, Germanna, Leilson, Luís (bee), Caio, Bará, Livia, Johnson, Rita e Juliano, e ao quinteto fantástico (Bruno, Lú, Lilian, Elisa e a Gi).

À Patrícia Rodrigues por ter sido mais que uma amiga durante esta caminhada, sempre me auxiliando e compartilhando os momentos bons e os menos bons vividos cá em Portugal.

Ao Stephan Dahl por ter estado sempre presente a me incentivar e torcer pelo meu sucesso. Estou sempre a aprender contigo!

À toda equipa dos Laboratórios 145 e 373, em especial àqueles que estiveram junto comigo na execução de toda parte experimental: João Pires, Karen Miranda, Ana Augusto, Catarina Tavares, Carolina Rodrigues e aos estagiários (Catarina, Fábio, Guilherme, Miguel, Micaela, Patrícia, Érica, Sara, Antônio), que tanto me ajudaram durante meus experimentos.

À Carla Martins pela grande ajuda com as análises de permeabilidade.

Ao Doutor Francisco Jorge Caldeira pela realização dos ensaios de microscopia de força atómica.

Ao Professor Doutor Rui Silva pela realização dos ensaios de microscopia eletrónica de varrimento.

À Andreia Lopes e ao Edgar pela ajuda com os ensaios mecânicos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e que aqui não tenha mencionado.

Muito Obrigado!

Resumo

Os biopolímeros são considerados uma alternativa aos produtos à base de petróleo, de forma a minimizar o problema decorrente da deposição destes resíduos. No entanto, quando comparados com os materiais tradicionais, os bioplásticos apresentam propriedades mecânicas e de barreira inferiores, o que limita a sua utilização. Desta forma, a incorporação de nanopartículas tem sido testada no sentido de melhorar estas propriedades e viabilizar a produção dos bioplásticos. Por outro lado, a funcionalização dos biopolímeros para embalagens destinadas a alimentos, por incorporação de extratos naturais, pode vir a substituir os aditivos sintéticos utilizados pela indústria alimentar. Assim, pretendeu-se com este estudo desenvolver uma nova embalagem ativa, à base de quitosano, incorporado com extratos naturais e nano reforçado com montmorilonite para utilização como embalagem primária para produtos cárneos.

Foram obtidos filmes com diferentes extratos (óleos essenciais (OEs) e extratos hidroalcoólicos) e diferentes montmorilonites como reforço, dos quais foram escolhidos o óleo essencial de alecrim (OEA) e o óleo essencial de gengibre (OEG) e a argila montmorilonite sódica (MMTNa) para produção dos filmes numa segunda etapa das experiências. A escolha destes óleos foi baseada na maior bioatividade que os mesmos conferiram aos filmes de quitosano. A argila foi selecionada devido ao seu maior caráter hidrofílico (maior afinidade com o polímero do que com os compostos ativos, permitindo libertação destes para os alimentos embalados).

Os bioplásticos resultantes foram caracterizados física e morfologicamente, e em termos das propriedades mecânicas e de barreira, assim como da sua bioatividade por meio de ensaios de migração com avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana. As embalagens foram também testadas “in situ” no acondicionamento de carne de frango crua. As imagens de microscopia e os resultados de difração de raios-x e de espectroscopia no infravermelho demonstram que os filmes produzidos apresentaram elevada homogeneidade, tendo ocorrido grande interação entre os componentes dos filmes. A incorporação da MMTNa resultou em melhoria da barreira ao oxigénio, da resistência dos filmes e da sua plasticidade, e os filmes apresentaram menor solubilidade em água. A incorporação dos óleos essenciais resultou em alterações significativas nas propriedades funcionais dos polímeros. Os testes “in situ” demonstraram que as carnes embaladas nos filmes de quitosano incorporados com os OEs mas sem adição

da argila apresentaram menores alterações físico-químicas ou microbiológicas ao longo do armazenamento sob refrigeração. Não foram observadas diferenças na qualidade das carnes devido aos diferentes óleos. No entanto, a adição dos óleos resultou em filmes mais permeáveis tanto ao oxigênio quanto ao vapor de água e com menor resistência mecânica. A incorporação de argila aos filmes contendo OEs atenuou estas alterações negativas, mas resultou num maior aprisionamento dos compostos ativos dos óleos essenciais, com diminuição das propriedades ativas dos filmes.

Conclui-se que os bio-nanocompósitos foram produzidos de forma satisfatória, tendo sido eficazes na extensão da vida de prateleira de carne de frango fresca. Quando não se procura um polímero reforçado, os filmes de quitosano apenas com incorporação do óleo essencial são os mais indicados, destacando-se as películas com adição de 0,5% OEA ou 1% OEG. Quando são necessárias melhores propriedades mecânicas e de barreira, sugere-se o uso dos bio-nanocompósitos incorporados com 0,5% OEA ou 2% OEG.

Palavras-chave: Biopolímeros, embalagens ativas, quitosano, montmorilonite, nanotecnologia, óleos essenciais, carne de frango, extensão do tempo de prateleira.

Abstract

Biopolymers are considered an alternative to the petroleum-based materials, once they can reduce the disposal problem created by the use of the latter. However, when compared to traditional materials, bioplastic have poor mechanical and barrier properties, limiting their use. Thus, the incorporation of nanomaterial into biopolymers has been used and evaluated as reinforcements to improve these properties and enable the production of bioplastics in large scale. In the other hand, the functionalization of the biopolymers aiming their use as food packaging by the incorporation of natural active compounds, which confers them antioxidant and antimicrobial activity, may substitute the synthetic additives widely used by the food industry. Thus, the objective of this study was to develop a new active packaging chitosan-based, a biodegradable renewable biopolymer, incorporated with natural antioxidant extracts and nanoreinforced with montmorillonite (MMT) for use as primary package of meat products.

Films were prepared using different extracts (essential oils (EOs) and hydro-alcoholic extracts) and different montmorillonites as reinforcements, from these, the two best essential oils (rosemary essential oil (REO) and ginger essential oil (GEO)) and the best nanoclay (sodium montmorillonite (MMTNa)) were chosen to produce the films in the second part of the experiment. The selection of these EOs was based on the highest active function conferred to the chitosan film. The nanoclay was chosen due to its higher hydrophilicity character (higher affinity to the polymer than to the active compounds, which enable higher diffusion of the preservatives compounds to the food packaged) when compared to the other nanoclays tested.

The resulting biopolymers were characterized, physically and morphologically, mechanical properties and gas and water vapor properties were also evaluated, as well as, their bioactivity by migration assays, antioxidant and antimicrobial activities. The films were also tested as primary packaging of raw chicken meat. The images of microscopy, the X-Ray and infrared spectroscopy results showed that the films produced had high homogeneity, indicating high interaction between the film components occurred. The incorporation of MMTNa resulted in improvements on the film oxygen barrier, mechanical strength and its plasticity,

and the films were less soluble in water. The incorporation of essential oils resulted in significant changes in the functional properties of polymers. "In situ" studies showed that the meat packed in chitosan films incorporated with the EOs but without addition of the clay presented minor physical-chemical or microbiological changes over the refrigerated storage. It was not observed relevant differences between the quality of the meat packaged with films incorporated with different EOs. However, the incorporation of EOs resulted in films with lower barrier against oxygen and water vapor and mechanical strength. The incorporation of the clay attenuated these negative changes but resulted in greater imprisonment of the active compounds of the essential oils, with decrease of the film's active properties.

In conclusion the bio-nanocomposites presented satisfactory results, having been effective in extending the shelf life of fresh chicken meat. When improvement of the mechanical and barrier properties is not an issue, the most indicated is the use of the chitosan film only incorporated with essential oil, and the films with 0,5% of REO or 1% of GEO can be highlighted. When better mechanical and barrier properties are demanded, it is suggested the use of the bio-nanocomposites incorporated with 0,5% of REO or 2% of GEO.

Keywords: Biopolymers, active packaging, chitosan, montmorillonite, nanotechnology, essential oils, poultry meat, shelf life extension.

Conteúdo

Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Lista de Tabelas.....	xv
Lista de Figuras.....	xvii
Lista de abreviaturas.....	xxi
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	5
2.1. EMBALAGENS ATIVAS	5
2.1.1. <i>Embalagens ativas antioxidantes</i>	7
2.1.1.1. Processo oxidativo e antioxidantes	7
2.1.1.2. Embalagens ativas como agentes antioxidantes em matrizes alimentares	10
2.2. POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS.....	14
2.2.1. <i>Nanotecnologia em materiais</i>	17
2.2.1.1. Montmorilonite.....	18
2.2.2. QUITOSANO.....	22
2.3. LEGISLAÇÃO	25
3. Material e Métodos.....	29
3.1. METODOLOGIA GERAL	29
3.2. MATERIAIS	30
3.3. SELEÇÃO DO EXTRATO NATURAL	31
3.3.1. <i>Preparação dos extratos hidroalcoólicos</i>	31
3.4. PREPARAÇÃO DOS FILMES	32
3.5. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES.....	34
3.5.1. <i>Difratometria de Raios-X (DR-X)</i>	34
3.5.2. <i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)</i>	35
3.5.3. <i>Caracterização morfológica dos nanocompósitos</i>	35

3.5.4. Análises térmicas.....	36
3.5.5. Avaliação da espessura e das propriedades mecânicas	37
3.5.6. Avaliação das propriedades óticas.....	39
3.5.7. Ângulo de contacto	40
3.5.8. Determinação da humidade, solubilidade e índice de intumescimento	40
3.5.9. Avaliação das propriedades de barreira ao vapor de água e oxigénio.....	41
3.6. CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES ATIVAS DO FILME	42
3.6.1. Atividade antimicrobiana “in vitro” - Teste de difusão em agar	42
3.6.2. Atividade antimicrobiana “in vitro” – Método contagem unidades formadoras de colónias	44
3.6.3. Ensaios de difusão dos antioxidantes	44
3.6.4. Atividade antioxidante “in vitro”	45
3.7. ATIVIDADE “IN SITU” DOS FILMES ATIVOS – APLICAÇÃO DAS PELÍCULAS ATIVAS.....	46
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	49
4. Seleção dos compostos ativos e da montmorilonite	51
4.1. SELEÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS DE ORIGEM NATURAL – AVALIAÇÃO DOS FILMES ATIVOS	51
4.1.1. Caracterização física dos filmes	52
4.1.1.1. Espessura dos filmes	52
4.1.1.2. Cor dos filmes.....	53
4.1.1.3. Transparência e opacidade	56
4.1.1.4. Solubilidade em água, humidade e índice de intumescimento.....	59
4.1.1.5. Propriedades mecânicas	62
4.1.2. Caracterização da atividade dos filmes.....	65
4.1.2.1. Caracterização dos OEs e EHAs.....	65
4.1.2.2. Ensaio de migração.....	67
4.1.2.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier.....	74
4.2. SELEÇÃO DA MELHOR MONTMORILONITE.....	76
4.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
5. Bio-nanocompósito quitosano / montmorilonite sódica / óleo essencial de alecrim.....	83

5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS FILMES.....	83
5.1.1. <i>Difratometria de Raios-X</i>	83
5.1.2. <i>Caracterização morfológica / estrutural dos filmes</i>	86
5.1.2.1. Microscopia eletrónica de varrimento (MEV)	86
5.1.2.2. Microscopia eletrónica de transmissão (MET)	88
5.1.2.3. Microscopia de força atómica (MFA).....	89
5.1.3. <i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)</i>	89
5.1.4. <i>Avaliação das propriedades térmicas</i>	92
5.1.5. <i>Avaliação da espessura e propriedades mecânicas</i>	98
5.1.6. <i>Avaliação das propriedades de barreira dos filmes – permeabilidade do vapor de água e do oxigénio (PVA e PO)</i>	100
5.1.6. <i>Avaliação das propriedades óticas</i>	102
5.1.6. <i>Solubilidade em água, índice de intumescimento e ângulo de contato</i>	105
5.2. AVALIAÇÃO “IN VITRO” DAS PROPRIEDADES ATIVAS DOS FILMES.....	109
5.2.1. <i>Atividade antimicrobiana – teste de difusão em agar</i>	109
5.2.2. <i>Atividade antimicrobiana – contagem de células viáveis</i>	112
5.2.3. <i>Migração de compostos fenólicos totais</i>	114
5.3. AVALIAÇÃO “IN SITU” DOS FILMES – ESTUDO DA VIDA DE PRATELEIRA DE CARNE FRESCA DE FRANGO.....	115
5.3.1. <i>Caracterização físico-química</i>	115
5.3.2. <i>Determinação das TBARS</i>	120
5.3.3. <i>Estudo da qualidade microbiológica das carnes</i>	123
5.4. <i>Considerações finais</i>	124
6. Bio-nanocompósito quitosano / montmorilonite sódica / óleo essencial de gengibre	127
6.1. CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS FILMES.....	127
6.1.1. <i>Difratometria de Raios-X</i>	127
6.1.2. <i>Caracterização morfológica dos filmes</i>	129
6.1.2.1. Microscopia eletrónica de varrimento (MEV)	129
6.1.2.2. Microscopia eletrónica de transmissão (MET)	131
6.1.2.3. Microscopia de força atómica (MFA).....	132
6.1.3. <i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)</i>	132
6.1.4. <i>Avaliação das propriedades térmicas</i>	134

6.1.5. Avaliação da espessura e das propriedades mecânicas	138
6.1.6. Avaliação das propriedades de barreira dos filmes – permeabilidade do vapor de água (PVA) e do oxigênio (PO).....	142
6.1.7. Avaliação das propriedades óticas.....	145
6.1.8. Solubilidade em água, índice de intumescimento e ângulo de contato.....	146
6.2. AVALIAÇÃO “IN VITRO” DAS PROPRIEDADES ATIVAS DOS FILMES	148
6.2.1. Atividade antimicrobiana – teste difusão em agar.....	148
6.2.2. Atividade antimicrobiana – contagem de células viáveis	151
6.2.3. Migração de compostos fenólicos totais	153
6.3. AVALIAÇÃO “IN SITU” DOS FILMES – ESTUDO DA VIDA DE PRATELEIRA DE CARNE FRESCA DE FRANGO	156
6.3.1. Caracterização físico-química.....	156
6.3.2. Determinação das TBARS	161
6.3.3. Estudo da qualidade microbiológica das carnes	163
6.4. Considerações finais.....	165
7. Considerações finais	167
8. Referências	173

Lista de Tabelas

Tabela 2.1. Algumas aplicações de embalagens ativas na indústria alimentar .	6
Tabela 2.2. Embalagens ativas e aplicações como agentes antioxidantes na indústria alimentar	11
Tabela 2.3. Nanomateriais e influência nos materiais de embalagens alimentares.....	19
Tabela 2.4. Regulamentos aplicados em embalagens e materiais intencionalmente produzidos para contacto com alimento.....	26
Tabela 3.1. Tratamentos utilizados na experiência de aplicação dos filmes	47
Tabela 4.1. Espessura e propriedades óticas dos filmes de quitosano.....	54
Tabela 4.2. Solubilidade em água, humidade e índice de intumescimento.....	59
Tabela 4.3. Propriedades mecânicas dos filmes.....	62
Tabela 4.4. Caracterização dos extratos hidroalcoólicos e óleos essenciais ...	65
Tabela 4.5. Cinética de difusão dos compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante no simulador	68
Tabela 4.6. Propriedades mecânicas e óticas dos filmes de quitosano incorporados com diferentes MMTs	79
Tabela 5.1. Temperatura de transição vítrea, temperaturas de degradação térmica e perdas de massa dos bio-nanocompósitos.	94
Tabela 5.2. Espessura e propriedades mecânicas dos bio-nanocompósitos sem (Controlo) ou com incorporação de montmorilonite sódica (MMTNa) e óleo essencial de alecrim (OEA).....	98
Tabela 5.3. Permeabilidades do vapor de água e do oxigénio dos bio-nanocompósitos.	101
Tabela 5.4. Resumo das propriedades óticas dos bio-nanocompósitos.	103
Tabela 5.5. Índice de intumescimento, solubilidade em água e ângulo de contato dos bio-nanocompósitos.....	106

Tabela 5.6. Atividade antimicrobiana “in vitro” do óleo essencial de alecrim e dos filmes ativos.	111
Tabela 5.7. Ensaio de migração - coeficientes de difusão e teores máximos migrados.....	114
Tabela 5.8. Estudo da vida de prateleira de carne fresca de frango – parâmetros físico-químicos.....	117
Tabela 5.9. Estudo da vida de prateleira de carne fresca de frango – qualidade microbiológica e oxidação lipídica.	122
Tabela 6.1. Temperatura de transição vítrea, temperaturas de degradação térmica e perdas de massa dos bio-nanocompósitos.....	136
Tabela 6.2. Espessura e propriedades mecânicas dos filmes sem ou com incorporação de montmorilonite sódica (MMTNa) e óleo essencial de gengibre (OEG).	139
Tabela 6.3. Propriedades de barreira e óticas dos bio-nanocompósitos.	143
Tabela 6.4. Índice de intumescimento, solubilidade em água e ângulo de contato dos bio-nanocompósitos.	148
Tabela 6.5. Resultado dos ensaios de atividade antimicrobiana “in vitro” e do ensaio de migração dos filmes incorporados com MMTNa e/ou OEG.	152
Tabela 6.6. Estudo da vida de prateleira de carne fresca de frango – parâmetros físico-químicos.....	158
Tabela 6.7. Estudo da vida de prateleira de carne fresca de frango – qualidade microbiológica e oxidação lipídica.	162

Lista de Figuras

Figura 2.1. Estrutura química dos principais antioxidantes sintéticos utilizados na indústria de alimentos	8
Figura 2.2. Mecanismos de ação antioxidantes dos bio-nanocompósitos.....	12
Figura 2.3. Mecanismo geral da biodegradação de plásticos	15
Figura 2.4. Esquema demonstrando as diferenças entre nanocompositos e bio-nanocompositos para aplicação como embalagem ativa de alimentos.....	16
Figura 2.5. Estrutura da Montmorilonite.	20
Figura 2.6. Interação nanoargila + polímero, estrutura: (a) tactoides (microcompósito); (b) intercalado (nanocompósito); e (c) esfoliado (nanocompósito). Aumento da tortuosidade devido a dispersão da MMT (d) ..	22
Figura 2.7. Estrutura básica do quitosano. n = grau de polimerização.....	23
Figura 3.1. Montagem do filme nas garras utilizadas no ensaio de tração.....	38
Figura 3.2. Exemplo de curva de ensaio de tração (Força x Extensão).....	38
Figura 3.3. Montagem dos ensaios “in situ”.....	47
Figura 4.1. Filmes de quitosano (A) controlo e incorporados com 1%: (B) OEA, (C) OEG, (D) OET, (E) OEM, (F) OES, (G) EHA_K, (H) EHA_A, (I) EHA_G, (J) EHA_CV, (K) EHA_CP, (L) EHA_S.....	52
Figura 4.2. Espectros de varrimento de filmes puros de quitosano e filmes incorporados com EHAs (A) ou OEs (B)	57
Figura 4.3. Ensaio de migração (compostos fenólicos totais no simulador alimentar).	70
Figura 4.4. Ensaio de migração (atividade antioxidante do simulador pelo método DPPH).....	71
Figura 4.5. Ensaio de migração (atividade antioxidante do simulador pelo método ABTS). Na figura A: (—●—) Controlo; (···○···) Quitosano + OEM; (—▼—) quitosano + OEA. Na figura B: (—●—) quitosano + OES; (···○···) quitosano + OET; (—▼—) quitosano + OEG. OEM (óleo essencial	

de melaleuca); OEA (óleo essencial de alecrim); OES (óleo essencial de salva); OET (óleo essencial de tomilho); OEG (óleo essencial de gengibre).	72
Figura 4.6. FT-IR dos filmes de quitosano.	75
Figura 4.7. Difractogramas das nanoargilas puras, filme de quitosano e dos filmes de quitosano incorporados com as diferentes MMTs. Qui (quitosano), MMT (montmorilonite).	77
Figura 5.1. Bio-nanocompósitos produzidos. Qui (quitosano); OEA (óleo essencial de alecrim); MMTNa (montmorilonite sódica)	84
Figura 5.2. Difractogramas dos bio-nanocompósitos. Qui (quitosano); OEA (óleo essencial de alecrim); MMTNa (montmorilonite sódica).	85
Figura 5.3. Fotomicrografias da topografia da superfície dos filmes: (A) quitosano; (B) quitosano + MMTNa; (C) quitosano + 2% OEA; (D) quitosano + 2% OEA + MMTNa. Ampliação de 1000x.....	86
Figura 5.4. Fotomicrografias da secção transversal dos filmes: (A) quitosano; (B) quitosano + MMTNa; (C) quitosano + 2% OEA; (D) quitosano + 2% OEA; (E) quitosano + 2% OEA + MMTNa; (F) quitosano + 2% OEA + MMTNa. Ampliações 1000 x (A, B, D e F) e 500 x (C e E).	87
Figura 5.5. Fotomicrografias dos filmes obtidas por MET: (A) quitosano + MMTNa; (B) quitosano + MMTNa + 2% OEA. Ampliação de 50000x.	89
Figura 5.6. Fotomicrografias da topografia dos filmes obtidas por MFA.	90
Figura 5.7. Espectro FT-IR dos bio-nanocompósitos. Filme quitosano (A); filme quitosano + MMTNa (B); filme quitosano + 2%OEA (C); filme quitosano + 2%OEA + MMTNa (D).	91
Figura 5.8. Análise termogravimétrica dos bio-nanocompósitos – perda de massa em função da temperatura. Qui (quitosano); OEA (óleo essencial de alecrim); MMT (montmorilonite sódica).	95
Figura 5.9. Transparência dos bionacompósitos. Qui (quitosano); OEA (óleo essencial de alecrim); MMT (montmorilonite sódica).....	105
Figura 5.10. Ilustração dos ângulos de contato dos filmes com água. Qui (quitosano); OEA (óleo essencial de alecrim); MMTNa (montmorilonite sódica)	108

Figura 5.11. Esquema dos possíveis mecanismos de ação dos óleos essenciais nas membranas microbianas	110
Figura 5.12. Estudo comparativo da qualidade microbiológica e grau de oxidação lipídica da carne de frango durante 10 dias de armazenamento. ...	126
Figura 6.1. Ilustração dos bio-nanocompósitos produzidos. Qui (quitosano); MMTNa (montmorilonite sódica); OEG (óleo essencial de gengibre).	128
Figura 6.2. Difractogramas dos bio-nanocompósitos. Qui (quitosano); MMTNa (montmorilonite sódica); OEG (óleo essencial de gengibre).	128
Figura 6.3. Fotomicrografias da topografia da superfície dos filmes: (A) quitosano; (B) quitosano + MMTNa; (C) quitosano + 2% OEG; (D) quitosano + 2% OEG + MMTNa. Ampliação de 1000x.....	129
Figura 6.4. Fotomicrografias da secção transversal dos filmes: (A) quitosano; (B) quitosano + MMTNa; (C) quitosano + 2% OEG; (D) quitosano + 2% OEG; (E) quitosano + 2% OEG + MMTNa; (F) quitosano + 2% OEG + MMTNa. Ampliações 1000 x (A, B, D e F) e 500 x (C e E).....	130
Figura 6.5. Fotomicrografias dos filmes obtidas por MET: (A) quitosano + MMTNa; (B) quitosano + MMTNa + 2% OEG. Ampliação de 50000x.....	132
Figura 6.6. Fotomicrografias da topografia dos filmes obtidas por MFA.	133
Figura 6.7. Espectro FT-IR dos bio-nanocompósitos. Qui (quitosano); OEG (óleo essencial de gengibre); MMTNa (montmorilonite sódica).	135
Figura 6.8. Análise termogravimétrica dos bionanocompósitos – perda de massa em função da temperatura. Qui (quitosano); MMTNa (montmorilonite sódica); OEG (óleo essencial de gengibre).....	137
Figura 6.9. Transparência dos bionanocompósitos. Qui (quitosano); OEG (óleo essencial de gengibre); MMT (montmorilonite sódica).....	147
Figura 6.10. Atividade antimicrobiana (teste difusão em agar).	149
Figura 6.11. Migração dos compostos fenólicos totais dos filmes ativos para o simulador.....	155

Lista de abreviaturas

ABTS	2,2'-Azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfônico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	“Attenuated total reflectance” – refletância total atenuada
b.h.	Base húmida
BHA	Butil hidroxianisol (BHA),
BHI	“Brain heart infusion agar”
BHT	Butil hidroxitolueno (BHT),
CFT	Compostos fenólicos totais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DCM	Departamento de Ciência dos Materiais
DCTB	Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazina
DQ	Departamento de Química
DR-X	Difratometria de Raios-X
DSC	Análise calorimétrica diferencial de varrimento
DTGA	Primeira derivada da perda de massa (%)
E	Elongação
EFSA	Autoridade Europeia de Segurança Alimentar
EHA	Extratos hidroalcoólicos
EHA_A	Extratos hidroalcoólicos de alecrim
EHA_CP	Extratos hidroalcoólicos de chá preto
EHA_CV	Extratos hidroalcoólicos de chá verde
EHA_G	Extratos hidroalcoólicos de gengibre
EHA_K	Extratos hidroalcoólicos de kenaf
EHA_S	Extratos hidroalcoólicos de salva

EUA	Estados Unidos da América
EVOH	Copolímero de etileno e álcool vinílico
FCT	Faculdade de Ciências e Tecnologia
FDA	“Food and Drug Administration”
FT-IR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier
GP	Galato de propilo
HR	Humidade relativa
hue*	Ângulo de hue
MCA	Materiais de contato com alimentos
MDA	Molondialdeído
ME	Módulo de elasticidade
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
MET	Microscopia eletrónica de transmissão
MEV	Microscopia eletrónica de varrimento
MFA	Microscopia de força atómica
MHA	“Mueller Hinton agar”
MMT	Montmorilonite
MMT20	Cloisite®20
MMTCa	Cloisite®Ca ²⁺
MMTNa	Cloisite®Na ⁺
MTV	Microrganismos totais viáveis
NPs	Nanopartículas
OEA	Óleo essencial de alecrim
OEG	Óleo essencial de gengibre
OEM	Óleo essencial de melaleuca
OEs	Óleos essenciais
OES	Óleo essencial de salva
OET	Óleo essencial de tomilho
OPA	Opacidade
PCA	“Plate count agar”
PCL	Polilactato, poli(ε-caprolactonas)

PDMS	Poli(dimetilsiloxano)
PEBD	Polietileno de baixa densidade
PHAs	Polihidroxicarbonos
PHB	Polihidroxibutiratos
PLA	Poliácido láctico
PO	Permeabilidade do oxigénio
PVA	Permeabilidade do vapor de água
PVC	Cloreto de polivinilo
QUI/MMT	Quitano/montmorilonite
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SF	Suspensão filmogénica
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBHQ	Butil hidroxiquinona
TCA	Ácido tricloroacético
Td	Temperatura de decomposição
TEP	1,1,3,3-Tetraetoxipropano
Tg	Temperatura de transição vítrea
TGA	Análise termo gravimétrica
TM	Tensão máxima
Trolox	Ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano
TSA	“Trypto-casein agar”
TSB	“Trypto-casein soy broth”
UE	União Europeia
UFC	Unidades formadoras de colónia
UNL	Universidade Nova de Lisboa
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
ΔM	Perda de massa

1

Introdução

No ramo alimentar, a oxidação é um processo de deterioração, que altera diversas propriedades, como a qualidade sensorial (sabor, aroma, textura e cor), valor nutricional e funcionalidade dos alimentos, além de gerar produtos tóxicos que podem representar um risco para a saúde dos consumidores (Araújo, 2011; Kolakowska e Bartosz, 2014). Inibir tais processos é de extrema importância para a manutenção da qualidade de alimentos com elevado teor em gordura.

Embalagens ativas antioxidantes podem ser classificadas em (i) absorvedoras (ex. saquetas absorvedoras de oxigênio) ou (ii) libertadoras (aquelas onde substâncias antioxidantes foram incorporadas intencionalmente na matriz polimérica, filmes ativos), e visam proteger o alimento embalado contra a oxidação (Tian, Decker, e Goddard, 2013). Esta tecnologia oferece inúmeras vantagens em comparação com a adição direta dos aditivos aos alimentos, tais como: necessidade de menores quantidades do aditivo; da ação ocorrer na superfície do alimento, ou seja, onde realmente acontecem os processos de deterioração; difusão controlada a partir da superfície dos filmes para a matriz alimentar (possibilitando um prolongamento do efeito protetor desejável do conservante); e a eliminação de passos adicionais dentro de um processo produtivo (Bolumar, Andersen, e Orlén, 2011).

Nos últimos anos, com a mudança dos hábitos alimentares e maior preocupação com a saúde, há uma tendência na população e consequentemente na indústria alimentar para se evitar, ou pelo menos reduzir o recurso a aditivos

sintéticos (Pereira de Abreu, Paseiro Losada, Maroto, e Cruz, 2011). Desta forma, há uma procura recente por novas tecnologias, como o uso de embalagens ativas antioxidantes, e aditivos alternativos, como os antioxidantes naturais, em substituição dos produtos sintéticos comerciais até então utilizados.

O quitosano é um biopolímero obtido da desacetilação da quitina, encontrada em exoesqueletos de crustáceos como o caranguejo e o camarão, e tida como o segundo polissacárido mais abundante na natureza (Assis e Alves, 2002). Devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, não toxicidade e capacidade de formar filmes, géis, fibras e partículas, tem sido estudada a utilização do quitosano em embalagens para alimentos na forma de revestimentos comestíveis (Souza, Morgado, Marque, Mattiuz, e Mattiuz, 2011) e filmes ativos (Moradi *et al.*, 2012; Siripatrawan e Noipha, 2012). Além disso, as reconhecidas propriedades antimicrobianas deste biopolímero (Siripatrawan e Noipha, 2012), podem representar uma mais valia da sua utilização em embalagem para alimentos pois possibilita esta ação ativa do filme na matriz alimentar.

Apesar dos biopolímeros terem elevado potencial de uso como embalagem de alimentos, algumas das suas características ainda limitam a sua utilização. Em geral, estes materiais apresentam propriedades de barreira e mecânicas relativamente reduzidas (Gandini e Belgacem, 2013; Rhim, Park, e Ha, 2013). Estudos apontam que tais lacunas podem ser superadas pelo uso da nanotecnologia, que procura criar novos materiais baseados na incorporação de nanocompostos em matrizes poliméricas (Rhim *et al.*, 2013).

A nanoargila montmorilonite (MMT) é um exemplo destes nanocompósitos de potencial uso para melhoria dos biopolímeros, a qual pode ser explicada pela presença de camadas esfoliadas da argila entre as cadeias poliméricas que possibilitam a redução da espessura, maior barreira ao vapor de água e oxigénio e resistência à tração (Azeredo, Mattoso, e McHugh, 2011) .

Desta forma, o desenvolvimento de um bio-nanocompósito ativo de quitosano/montmorilonite incorporado com extratos naturais é justificado uma vez que se trata de um produto sustentável, conveniente, e que tende a agregar maior

confiabilidade e qualidade ao alimento mantendo a sua segurança, sendo apelativo ao consumidor.

Além disto, com a incorporação da nanoargila nos filmes ativos, espera-se que haja uma melhoria nas propriedades de barreira, mecânicas e térmicas do biopolímero, o que pode possibilitar a sua viabilidade à escala industrial como embalagens para alimentos.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver bio-nanocompósitos de quitosano/montmorilonite na forma de filme ativo incorporado com extratos naturais para aplicação em carnes frescas de aves.

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- ✓ Desenvolver bio-nanocompósitos quitosano/montmorilonite (QUI/MMT) na forma de filmes ativos incorporados com extratos naturais e estudar a interação das diferentes argilas e extratos com o polímero;
- ✓ Avaliar as propriedades físicas, mecânicas, estruturais, colorimétricas e de barreira dos filmes produzidos;
- ✓ Avaliar a difusão dos compostos antioxidantes do filme;
- ✓ Estudar a atividade antioxidante dos filmes bio-nanocompósitos “in vitro”;
- ✓ Estudar a atividade antimicrobiana dos filmes bio-nanocompósitos “in vitro”;
- ✓ Estudar a eficácia antioxidante e antimicrobiana dos filmes bio-nanocompósitos em contacto com carne de frango crua;

2

Revisão da Literatura

2.1. Embalagens ativas

Proporcionar uma barreira inerte ao meio exterior assegurando uma maior vida de prateleira aos alimentos embalados pode ser considerada a principal função das embalagens alimentares tradicionais. Entretanto, nas últimas décadas, com o desenvolvimento de tecnologias e investigação, novas funções têm surgido para as embalagens alimentares (Soares *et al.*, 2009).

Novos materiais de embalagens alimentares são capazes de interagir com o produto embalado (embalagens ativas e inteligentes), desempenhando para além das funções tradicionais de conter, transportar, informar, vender e proteger os alimentos do meio externo (luz, oxigénio, humidade, etc.), uma vantagem adicional por transmitirem intencionalmente funcionalidades específicas para o sistema embalagem-alimento (Santana, Machado, Silva, Nunes, e Druzian, 2013; Soares *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2013).

A expressão embalagem ativa foi utilizada pela primeira vez por Labuza e Breene (1989) para definir as novas tecnologias de embalagens utilizadas na preservação / extensão da vida de prateleira de produtos alimentícios refrigerados que convergiam com a procura dos consumidores em termos de proporcionar produtos de alta qualidade com frescura e segurança. Como exemplo de tais inovações tecnológicas, os autores citam materiais com capacidade de controlar

a composição da atmosfera de embalagem dos alimentos (emissores/sequestradores de etileno, oxigénio ou dióxido de carbono) e filmes finos com incorporação de agentes conservantes. Atualmente novas aplicações para as embalagens ativas na indústria de alimentos podem ser citadas, como resumido na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Algumas aplicações de embalagens ativas na indústria alimentar

Classe de embalagem ativa	Subclasses
Sequestro / absorção de compostos	Absorvedores de oxigénio, etileno, humidade, dióxido de carbono, radiação ultravioleta (UV), etc.
Libertação / emissão de compostos	Emissor de dióxido de carbono, etanol, antioxidantes / antimicrobianos, aromas, etc.
Remoção de compostos	Catalisando a remoção de componentes do alimento, como colesterol e lactose.
Controlo de temperatura	Embalagens com auto aquecimento / arrefecimento, materiais de embalagens sensíveis à temperatura, etc.

Adaptado de (Lee, Lee, Choi, e Hur, 2015; Prasad e Kochhar, 2014)

As embalagens ativas podem ser destacadas entre as recentes tecnologias desenvolvidas pois conferem ao alimento embalado proteção contra processos deterioradores por meio dos compostos ativos nelas incorporados que podem atuar como conservantes (Istiv, 2012; Rhim e Ng, 2007; Souza, Rodrigues, Duarte, e Fernando, 2018; Tang, Kumar, Alavi, e Sandeep, 2012; Tian *et al.*, 2013, Santos *et al.*, 2018), além da função clássica de proteger o produto das condições externas (barreira física).

Substituir a adição direta de aditivos na matriz alimentar pela sua incorporação no material de embalagem - para que este desempenhe a função ativa protetora ao longo do tempo de prateleira - resulta em inúmeras vantagens, nomeadamente: prolongamento do efeito protetor desejável do conservante, uma vez que a difusão do mesmo ocorre de forma gradual; redução das quantidades ingeridas de aditivos químicos; ação mais efetiva, visto que ocorrem na superfície do alimento, onde realmente acontecem os processos de deterioração; e possível eliminação de passos adicionais dentro de um processo produtivo,

como por exemplo uma etapa de mistura ou imersão, para adição dos mesmos (Bolumar *et al.*, 2011; Siripatrawan e Vitchayakitti, 2016).

O desenvolvimento de reações oxidativas e de microrganismos deteriorantes são os principais limitantes na vida útil do alimento produzido (Araújo, 2011; Kolakowska e Bartosz, 2014), desta forma, a incorporação de compostos antimicrobianos e / ou antioxidantes nos materiais de embalagem tem vindo a ganhar destaque (Siripatrawan e Noipha, 2012).

Embalagens ativas antioxidantes são aquelas onde substâncias antioxidantes foram incorporadas intencionalmente na matriz polimérica com o objetivo de conferir atividade antioxidante (Tian *et al.*, 2013).

2.1.1. Embalagens ativas antioxidantes

2.1.1.1. Processo oxidativo e antioxidantes

O processo oxidativo pode ser entendido como o resultado da adição de oxigénio ou remoção de hidrogénio/eletrões num sistema reacional, podendo ser catalisado por diferentes fatores, nomeadamente calor, presença de luz, determinados iões metálicos, enzimas ou metaloproteínas (Felisberto, Lamas, Lopes, Sousa, e Rodrigues, 2011).

Em matrizes alimentares, na maior parte dos casos, a oxidação é considerada um processo deteriorador, responsável por uma gama de importantes alterações nos produtos ao longo de sua vida de prateleira (Pazos e Medina, 2014). Perdas nutricionais, modificações na textura, cor, aroma e sabor devido ao desenvolvimento de compostos indesejáveis ou mesmo tóxicos ao consumo humano são alguns dos exemplos das consequências deste processo nos alimentos (Márquez-Ruiz, Holgado, e Velasco, 2014; Pazos e Medina, 2014).

A *Food and Drug Administration* (FDA) define antioxidantes como as substâncias usadas para preservar alimentos por meio da redução da deterioração, rancidez e descoloração resultante de processos oxidativos (FDA, 2012). Na indústria alimentar são geralmente adicionados durante o processamento do alimento e de origem sintética, sendo, desta forma, classificados como

antioxidantes sintéticos (Araújo, 2011; Ramalho e Jorge, 2006). Os principais antioxidantes sintéticos empregados na indústria alimentar são butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), butil hidroxiquinona (TBHQ) e galato de propilo (GP) (Ramalho e Jorge, 2006) (Figura 2.1).

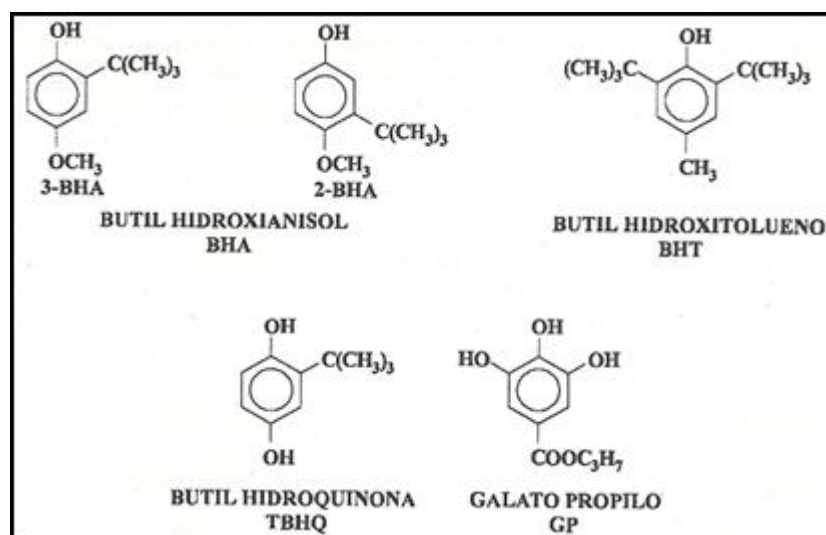


Figura 2.1. Estrutura química dos principais antioxidantes sintéticos utilizados na indústria de alimentos (Araújo, 2011).

Apesar da excelente ação conservante dos aditivos sintéticos, o seu consumo vem sendo questionado ultimamente devido ao possível efeito prejudicial para a saúde atribuído à sua ingestão em doses superiores aos limites recomendados (Santana *et al.*, 2013). Deste modo, formas alternativas de preservação dos alimentos são investigadas, seja por meio da utilização de compostos antioxidantes de fontes naturais, maioritariamente compostos fenólicos extraídos de plantas e frutas (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe, e Serna-Saldívar, 2014; Moo-Huchin *et al.*, 2014, 2015; Manuel Viuda-Martos *et al.*, 2011) ou por meio do desenvolvimento de novas tecnologias como as embalagens ativas antioxidantes (Barbosa-Pereira *et al.*, 2013; Bolumar *et al.*, 2011; Contini *et al.*, 2011; López-de-Dicastillo, Gómez-Estaca, Catalá, Gavarra, e Hernández-Muñoz, 2012; Nerín, Tovar, e Salafranca, 2008; Siripatrawan e Noipha, 2012; Souza *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2013).

Os antioxidantes naturais, extraídos de plantas e frutas, têm sido o foco de recentes estudos como uma nova estratégia para prevenção dos processos oxidativos por meio da incorporação dos mesmos em matrizes poliméricas para

aplicação na indústria de embalagens alimentares (Barbosa-Pereira, Aurrekoetxea, Ângulo, Paseiro-Losada, e Cruz, 2014; Contini *et al.*, 2011; Siripatrawan e Vitchayakitti, 2016; Tian *et al.*, 2013). Vários autores têm demonstrado a eficácia na preservação de diferentes alimentos com o uso de tal tecnologia (Abdollahi, Rezaei, e Farzi, 2014; Barbosa-Pereira *et al.*, 2014; Bolumar *et al.*, 2011; Calatayud *et al.*, 2013; Contini *et al.*, 2014; López-de-Dicastillo *et al.*, 2012; Lopez de Dicastillo *et al.*, 2011; Remya *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017).

Devido ao elevado conteúdo em compostos fenólicos, frutas (uva (Silva, Stringheta, Teófilo, e Oliveira, 2013), jabuticaba (Castro, Silva, Oliveira, Desobry, e Humeau, 2014; Leite-Legatti *et al.*, 2012), açaí (Del Pozo-Insfran, Brenes, e Talcott, 2004), romã (Fischer, Carle, e Kammerer, 2011), carambola (Zainudin, Hamid, Anwar, Osman, e Saari, 2014), amoras (Souza *et al.*, 2014), maracujá (Assis *et al.*, 2009; Spínola, Pinto, e Castilho, 2015), cajus (Moo-Huchin *et al.*, 2015), entre outros) e plantas (diferentes extratos de plantas (Balasundram, Sundram, e Samman, 2006), óleos essenciais (Regnier, Combrinck, e Du Plooy, 2012; Ribeiro-Santos, Andrade, Melo, e Sanches-Silva, 2017), *Pistacia lentiscus* (Dahmoune *et al.*, 2014), kenaf (Pascoal, Quirantes-Piné, Fernando, Alexopoulou, e Segura-Carretero, 2015), entre outros) são reconhecidas como excelentes fontes de compostos bioativos capazes de estabilizar radicais livres, como as espécies reativas de oxigénio (ROS), por meio de diferentes mecanismos onde se inclui a transferência de átomos de hidrogénio, reduzindo e estabilizando os mesmos, e consequentemente evitando o processo oxidativo (Kolakowska e Bartosz, 2014).

Os compostos fenólicos são uma extensa classe de moléculas (mais de 800 tipos já foram registrados), que se encontram amplamente distribuídas no reino vegetal sendo caracterizadas por possuírem pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxilo, os quais conferem a capacidade de doar eletrões ou átomos de hidrogénio, e desta forma, funcionar como potentes antioxidantes naturais (Huber e Rodriguez-amaya, 2008; Zamora, Delgado, e Hidalgo, 2014).

O grande limitador da utilização de extratos naturais ricos em compostos fenólicos na produção de embalagens alimentares é a degradação térmica sofrida pelos mesmos (Azmir *et al.*, 2013), o que impede a utilização dos processos de extrusão tradicionalmente empregues na produção dos plásticos a nível industrial. Desta forma, a incorporação destes extratos naturais é geralmente realizada por meio da sua dispersão na matriz polimérica utilizando-se o método de confeção a frio (Tian *et al.*, 2013).

O nano-encapsulamento pode ser uma solução viável para aumentar a estabilidade térmica dos compostos fenólicos, possibilitando o seu uso em métodos tradicionais de produção de polímeros, como realizado por Woranuch e Yoksan (2013). Estes autores nano-encapsularam o eugenol em nanopartículas de quitosano para posterior incorporação em amido termoplástico extrusado a 155 °C. O plástico produzido apresentou um teor final de eugenol 8 vezes superior e uma capacidade antioxidante 2,7 vezes superior à do material contendo eugenol desencapsulado (Woranuch e Yoksan, 2013).

2.1.1.2. Embalagens ativas como agentes antioxidantes em matrizes alimentares

Nos últimos anos, muitas pesquisas com embalagens ativas antioxidantes (Tabela 2.2) vêm sendo desenvolvidas com aplicação nos mais variados alimentos (produtos cárneos – carne bovina, suína, aves ou pescado - cereais, óleos e seus derivados) (Tian *et al.*, 2013).

Os agentes antioxidantes são aplicados nas embalagens de diferentes formas, nomeadamente: independentemente na forma de saquetas e etiquetas adesivas; por adsorção física/revestimento na superfície do material de embalagem; incorporados na matriz polimérica; através de filmes multicamadas e através de imobilização covalente na superfície de contato da embalagem com o alimento (Almeida *et al.*, 2010; Coma, 2008; Nunes *et al.*, 2013; Prasad e Kochhar, 2014; Soares *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2013).

Inicialmente, os estudos foram conduzidos utilizando antioxidantes sintéticos incorporados nas matrizes poliméricas, porém, para atender à nova

tendência dos consumidores, que procuram cada vez mais reduzir o consumo deste tipo de aditivos, investigações recentes têm sido focadas na utilização de substâncias naturais, como tocoferóis, extratos vegetais e óleos essenciais de plantas como orégão, canela, cravo-da-índia, alecrim, gengibre entre outros (Gómez-Estaca, López-de-Dicastillo, Hernández-Muñoz, Catalá, e Gavara, 2014; López-de-Dicastillo *et al.*, 2012; Remya *et al.*, 2016; Ribeiro-Santos *et al.*, 2015; Ribeiro-Santos, Andrade, *et al.*, 2017).

Tabela 2.2. Embalagens ativas e aplicações como agentes antioxidantes na indústria alimentar

Polímero	Antioxidante	Alimento	Referência
Polietileno de baixa densidade (PEBD)	BHT e α -tocoferol	Flocos de aveia	(Wessling, Nielsen, e Giacin, 2001)
Acetato de celulose	Sulfito e cisteína	Maças fatiadas	(Oliveira, Fátima, Soares, Paula, e Viana, 2008)
Quitosano	Extrato de chá verde	Salsicha de porco	(Siripatrawan e Noipha, 2012)
Copolímero de etileno e álcool vinílico (EVOH)	Diferentes antioxidantes naturais	Sardinhas salgadas	(López-de-Dicastillo <i>et al.</i> , 2012)
Acetato de celulose	Óleo essencial de alecrim	Peito de frango	(Melo <i>et al.</i> , 2012)
PEBD	α -tocoferol	Salmão	(Barbosa-Pereira <i>et al.</i> , 2013)
Quitosano	Extrato de urucum	Óleo de palma	(Santana <i>et al.</i> , 2013)
Quitosano	Óleo essencial de alecrim	Filetes peixe	(Abdollahi <i>et al.</i> , 2014)
Quitosano	Óleo essencial de gengibre	Peixe	(Remya <i>et al.</i> , 2016)

De acordo com o mecanismo de ação, os antioxidantes são classificados em dois grandes grupos, nomeadamente: antioxidantes primários ou secundários (Viuda-Martos e Pérez-Álvarez, Fernández-López, 2014). Alguns compostos ativos podem ainda ser classificados nos dois grupos devido à capacidade

de atuar por meio dos dois mecanismos (Tian *et al.*, 2013). Desta forma, de maneira análoga, as embalagens ativas antioxidantes também podem ser classificadas por meio deste critério (Figura 2.2).

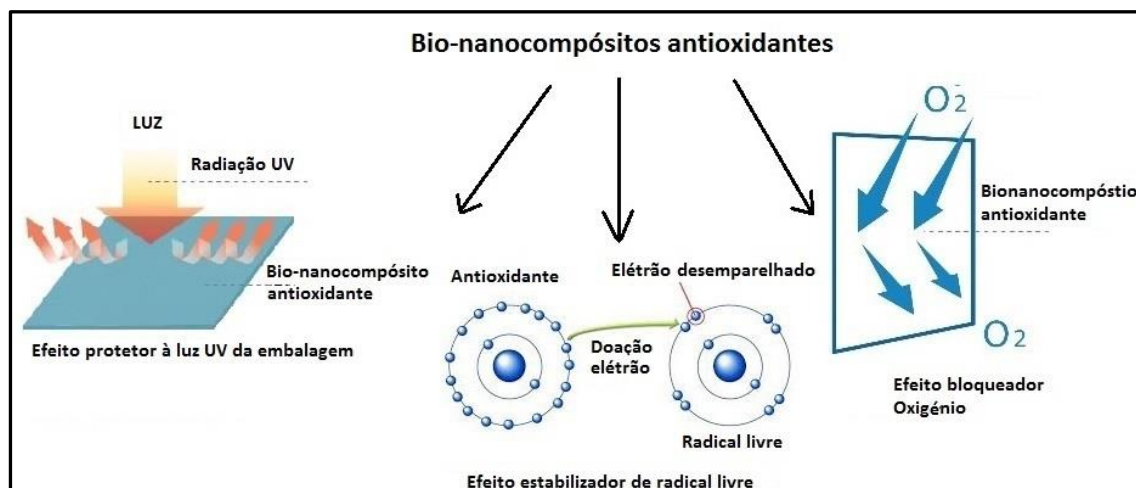


Figura 2.2. Mecanismos de ação antioxidantes dos bio-nanocompósitos

Os antioxidantes primários atuam estabilizando radicais livres por meio da doação de um átomo de hidrogénio ou elétron para os compostos instáveis (Araújo, 2011). Desta forma, a reação oxidativa em cadeia é evitada e/ou retardada, e consequentemente, a vida de prateleira dos produtos é prolongada (Kolakowska e Bartosz, 2014; Márquez-Ruiz *et al.*, 2014).

As embalagens ativas antioxidantes podem ser classificadas como antioxidantes primários uma vez que o mecanismo principal de preservação dos alimentos embalados é realizado através da migração gradual dos compostos ativos incorporados na matriz polimérica para o alimento, que, por sua vez, estabilizam os radicais livres, prevenindo o processo oxidativo (Tian *et al.*, 2013). Materiais de embalagem vêm sendo desenvolvidos de forma bem sucedida com a incorporação de antioxidantes naturais (vitaminas, compostos fenólicos ou extratos naturais com altos teores dos mesmos), como tocoferol reportado por Dias *et al.* (2014) e Munteanu *et al.* (2014), própolis (Siripatrawan e Vitchayakitti, 2016), extratos de diferentes plantas (Souza, Rodrigues *et al.*, 2018), entre outros compostos.

Todavia, o sucesso no desenvolvimento deste tipo de embalagens está condicionado por dois fatores: a manutenção da atividade antioxidante do

composto ativo após produção do filme/embalagem; e ocorrência da difusão gradual do mesmo para o alimento embalado (Calatayud *et al.*, 2013), garantindo a ação do agente. Desta forma, é primordial que se assegure um processo de produção da embalagem que não degrade os compostos ativos, e uma correta escolha do polímero e aditivos a serem utilizados de modo a garantir uma boa compatibilidade e posterior difusão para o alimento.

Os antioxidantes secundários evitam/retardam os processos oxidativos devido à sua capacidade de eliminar catalisadores de tais reações, atuando como quelantes, sequestradores de oxigênio ou bloqueadores de luz (especialmente radiação ultravioleta) (Tian *et al.*, 2013). Em ação sinérgica com os antioxidantes primários há ainda um aumento da capacidade de proteção contra a deterioração oxidativa (Araújo, 2011).

Desta forma, as embalagens atuam também preservando o alimento como antioxidantes secundários uma vez que protegem os produtos embalados do ambiente externo, funcionando como uma barreira física aos gases (oxigênio) e à luz (Labuza e Breene, 1989).

Entre as matrizes poliméricas estudadas recentemente, podem destacar-se os biopolímeros, que têm despertado interesse devido ao seu caráter sustentável (Rhim e Ng, 2007). Geralmente, estes biomateriais são de fontes proteicas ou polissacarídicas, e apresentam boa barreira ao oxigênio (Ferreira *et al.*, 2016; Rhim *et al.*, 2013), garantindo uma proteção extra ao processo oxidativo. Aparentemente, compostos fenólicos têm a capacidade de diminuir a transparência dos materiais poliméricos onde são incorporados devido ao seu diferente índice de refração o que provoca o fenômeno de espalhamento de luz, tornando o material mais opaco (López-Mata *et al.*, 2013). Desta forma, o alimento embalado neste tipo de embalagem estará menos exposto à luz e à radiação UV, e por consequência ao processo oxidativo. Este comportamento foi observado em filmes de quitosano incorporados com extratos de chá verde (Siripatrawan e Harte, 2010), com carvacrol em três diferentes concentrações (López-Mata *et al.*, 2013), ou com diferentes óleos ou extratos hidroalcoólicos de diferentes plantas (Souza *et al.*, 2017). Pastor *et al.* (2013) e Kanatt *et al.* (2012) reportaram

comportamento semelhante em compósitos à base de quitosano/polivinil-álcool incorporados com extratos aquosos de menta e romã, e compósitos de quitosano/metil celulose adicionados com resveratrol, respetivamente. Embalagens com tais características são, desta forma, vantajosas em relação às tradicionais uma vez que possuem maior proteção contra o processo oxidativo, demonstrando potencial para utilização na indústria alimentar.

2.2. Polímeros biodegradáveis

O contínuo aumento na procura e uso de materiais plásticos nos últimos anos resultou num problema ambiental à escala mundial sobre o tratamento dos resíduos gerados (Shah, Hasan, Hameed, e Ahmed, 2008; Souza e Fernando, 2016). O plástico não biodegradável representa 73% do lixo em qualquer habitat aquático à escala global (Bergmann, Tekman, e Gutow, 2017), sendo cerca de 4,8-12,7 Mt a quantidade de resíduos plásticos que entram nos oceanos por ano (Worm, Lotze, Jubinville, Wilcox, e Jambeck, 2017). Os polímeros causam uma série de danos ao ambiente, visto que persistem ao longo de centenas de anos sem se degradarem, contaminando tanto o solo onde estão, como a vida marinha, e até mesmo a cadeia de produção de alimentos (Sadeghi e Mahsa, 2015; Vince e Hardesty, 2017).

Com o objetivo de minimizar os impactos ambientais, em convergência com as novas tendências e exigências dos consumidores por produtos mais amigos do ambiente (“ecofriendly”), a indústria tem procurado desenvolver e utilizar polímeros mais facilmente degradáveis (Imran *et al.*, 2010). Entre os substitutos para os plásticos não biodegradáveis derivados do petróleo destacam-se os biopolímeros - biomoléculas poliméricas produzidas por organismos vivos, que possuem a vantagem de serem biodegradáveis (Avella, Bonadies, Martuscelli, e Rimedio, 2001; Lucas *et al.*, 2008; Petersen *et al.*, 1999), com potencial para serem a futura geração dos materiais de embalagem (Petersen *et al.*, 1999).

Tais materiais são classificados em três grandes grupos de acordo com sua origem/forma de obtenção, nomeadamente: diretamente extraídos ou removidos de fontes naturais (amido, caseínas, gelatinas, pectina, xilano, nanofibrilas de celulose, metil celulose, hidroxipropil-celulose, lenhina, galactoglucomanas,

proteínas, quitosano, celulose, etc.); sintetizados por mecanismos clássicos químicos a partir de biomonomeros derivados de fontes renováveis (polilactato, poli(ϵ -caprolactonas) (PCL), polivinil álcool, etc.); ou produzidos por fermentação microbiana (poliácido láctico (PLA) ou ácido poliláctico, polihidroxialcanos (PHAs), polihidroxibutiratos (PHB), etc.) (Petersen *et al.*, 1999; Rhim *et al.*, 2013; Sadeghi e Mahsa, 2015).

O processo de biodegradação pode ser entendido como aquele onde microrganismos degradam de forma aeróbia (presença de oxigênio) ou anaeróbia (anaerobiose) os materiais poliméricos, resultando em dióxido de carbono, água, compostos inorgânicos, metano e biomassa (Chandra e Rustgi, 1998; Lucas *et al.*, 2008) (Figura 2.3).

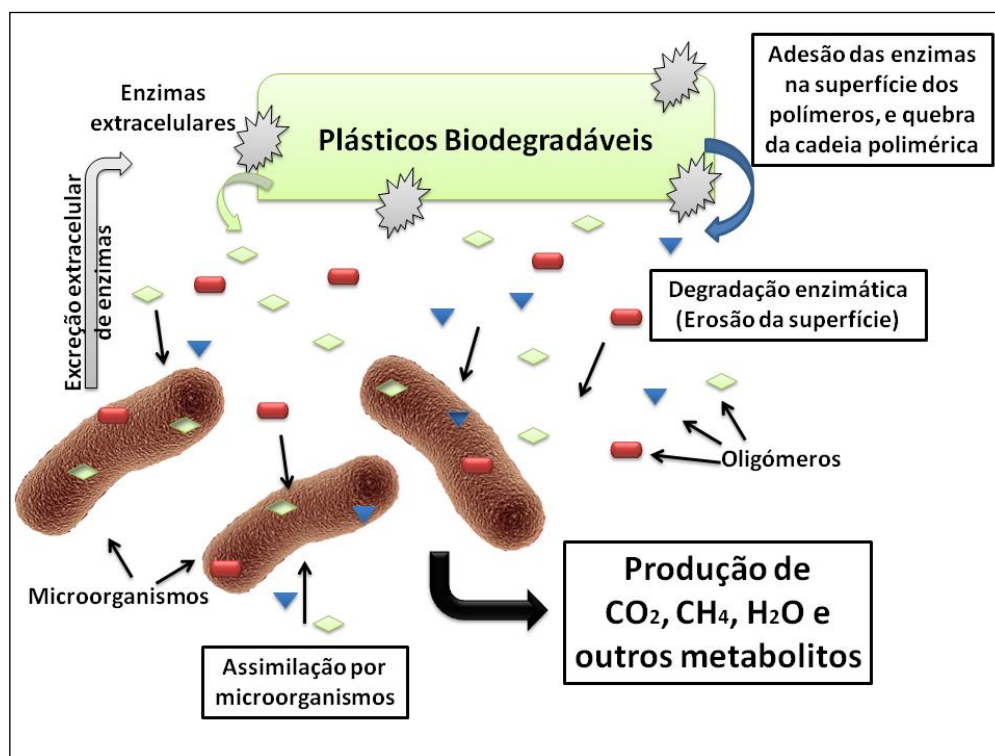


Figura 2.3. Mecanismo geral da biodegradação de plásticos (Souza e Fernando, 2016).

Apesar desta vantajosa característica dos biopolímeros biodegradáveis, as propriedades funcionais destes materiais são inferiores às dos derivados de petróleo, nomeadamente as propriedades mecânicas e de barreira, o que limita a sua utilização pela indústria de embalagens alimentares (Espitia *et al.*, 2013; Rhim *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2012).

Por meio do uso da nanotecnologia é possível reforçar (incorporação de nanomateriais/nanorreforço com pelo menos uma dimensão em escala nanométrica – 0 a 100 nm) estes materiais, produzindo os nanocompósitos, mais adequados para utilização à escala industrial (Azeredo, 2009; Neethirajan e Jayas, 2010; Rhim e Ng, 2007; Sadeghi e Mahsa, 2015).

Desta forma, os nanocompósitos podem ser definidos como materiais multifásicos obtidos pela combinação de uma fase contínua (matriz) e uma descontínua (enchimento) com pelo menos uma dimensão em escala nanométrica (Bacakova *et al.*, 2011). Os materiais em que a fase contínua é um biopolímero, denominam-se bio-nanocompósitos (Ramos, Jiménez, Peltzer, e Garrigós, 2014) (Figura 2.4).

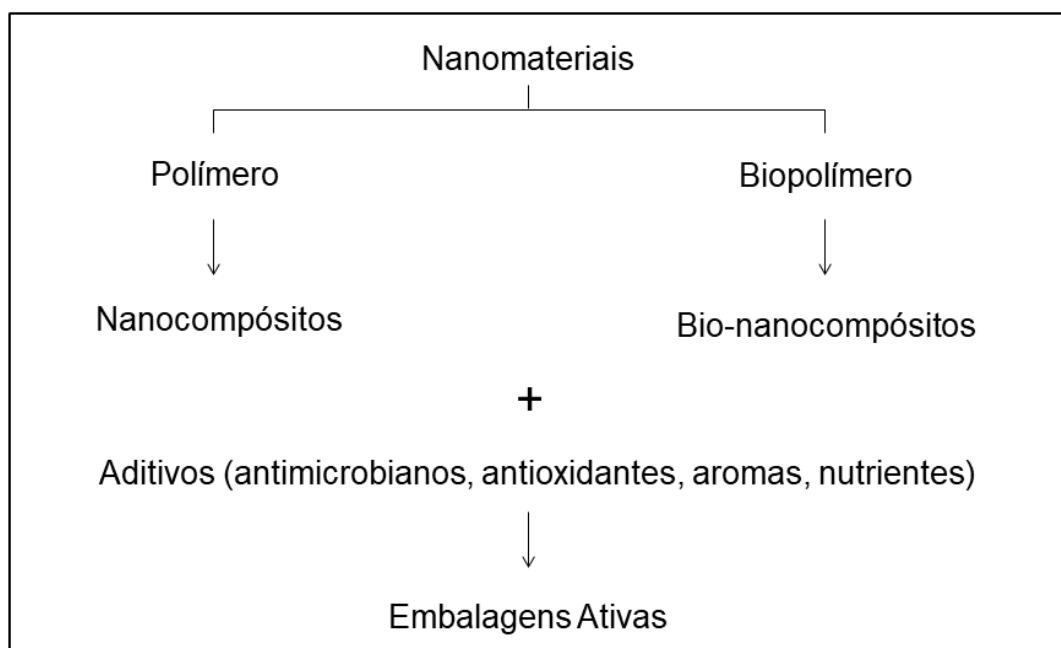


Figura 2.4. Esquema demonstrando as diferenças entre nanocompositos e bio-nanocompositos para aplicação como embalagem ativa de alimentos

Neste âmbito, o desenvolvimento de materiais de embalagem para alimentos à base de biopolímeros, incorporados com antioxidantes naturais e reforçados com nanomateriais (bio-nanocompósitos) surge como uma alternativa promissora a ser considerada pela indústria alimentar por se adequar às preocupações ambientais, mantendo a qualidade do produto e contribuindo para extensão da sua vida de prateleira (Ramos, Jiménez, *et al.*, 2014).

2.2.1. Nanotecnologia em materiais

Nanotecnologia é o ramo da ciência focado no estudo da caracterização, produção e manipulação de estruturas de origem biológica ou não biológica com dimensões inferiores aos 100 nm (Slavutsky, Bertuzzi, e Armada, 2012).

A redução do tamanho de um material acarreta uma série de mudanças nas suas propriedades. Em escalas de tamanhos nanométricos, é possível obter-se materiais com características excelentes para utilização como enchimento (“fillers”) em embalagens, resultando em melhorias consideráveis do ponto de vista de flexibilidade, propriedades térmicas, mecânicas e de barreira a gases (Cushen, Kerry, Morris, Cruz-Romero, e Cummins, 2012) quando comparados com o polímero inicial sem incorporação dos nanomateriais. O arranjo interno à escala micro e nano pode melhorar propriedades funcionais, morfológicas e de estabilidade de matrizes poliméricas (Slavutsky *et al.*, 2012).

O uso da nanotecnologia em materiais de contato com alimentos (MCA) é a maior aplicação deste tipo de tecnologia dentro do setor alimentar, tendo sido dividido em quatro grandes categorias de acordo com Chaudhry *et al* (2008): (i) MCAs com melhoria das propriedades (mecânicas, térmicas e de barreira a gases) devido à incorporação das nanopartículas (NPs); (ii) Embalagens ativas que apresentam propriedade adicional como ação antimicrobiana devido ao nanocomposto adicionado; (iii) Embalagens inteligentes, resultantes da incorporação de nano sensores; e (iv) Compósitos de polímeros biodegradáveis e nanomateriais, biopolímeros com propriedade melhoradas devido o nanorreforço.

Por meio da utilização dos nanomateriais na produção de embalagens é possível ainda reduzir-se a quantidade de material plástico necessário, assim como o consumo de derivados do petróleo e volume de resíduos não biodegradáveis produzidos, contribuindo desta forma para a preservação do ambiente (Sozer e Kokini, 2009). Tais alterações tornam o processo do ponto de vista de custo mais eficiente e vantajoso (Goyal e Goyal, 2012).

Os dois principais objetivos da incorporação de nanomateriais em matrizes poliméricas para confecção de embalagens plásticas são: criar funcionalidades extras (basicamente as nanopartículas de óxidos metálicos - embalagens

ativas e inteligentes) ou reforçar as propriedades funcionais dos materiais desenvolvidos (sejam térmicas, de barreira ou mecânicas) (Azeredo *et al.*, 2011).

Tais benefícios são alcançados com baixas quantidades incorporadas, geralmente menores que 5% (p/p) (Goyal e Goyal, 2012). No caso específico da utilização de montmorilonite (MMT), em quantidades elevadas (superiores a 10% p/p) ocorre aglomeração da nanoargila, reduzindo a sua eficácia como agente de reforço (Ludueña, Vázquez, e Alvarez, 2013).

Os nanomateriais de reforço mais estudados são os nanotubos de carbono, as nanoceluloses, as nanopartículas de quitosano, MMT, e algumas nanopartículas de óxidos metálicos. As últimas também resultam em propriedade ativas podendo igualmente ser utilizadas para desenvolvimento desta tecnologia (Azeredo *et al.*, 2011; Rhim *et al.*, 2013, Pires, Souza e Fernando, 2019).

Resumidamente na Tabela 2.3 exemplificam-se alguns dos principais nanomateriais já utilizados com tais objetivos.

Entre os nanomateriais utilizados como reforço (“fillers”) polimérico (foco deste trabalho), a argila montmorilonite destaca-se devido à sua disponibilidade, baixo custo, bons resultados de reforço, e relativamente simples processabilidade (Azeredo *et al.*, 2011; Goyal e Goyal, 2012)

2.2.1.1. Montmorilonite

A montmorilonite é uma argila extraída de rochas vulcânicas (bentonites), cuja composição química e a fórmula da célula unitária da montmorilonite “teórica” é $(Al_{3,33}Mg_{0,67})Si_8O_{20}(OH)_4 \cdot M^{+1}_{0,67}$, onde M^{+1} é o catião monovalente ou o catião de troca, o qual balanceia a carga elétrica negativa (devida à substituição isomórfica do Al^{+3} por Mg^{+2}) (Coelho, Santos, & Santos, 2007). Pertence ao grupo dos filossilicatos onde os átomos de silício têm uma coordenação tetraédrica enquanto que os de alumínio uma coordenação octaédrica, arranjados em lâminas com aproximadamente 1 nm de espessura (Figura 2.5) (Coelho, Santos, e Santos, 2007; Gomes, 1988).

Tabela 2.3. Nanomateriais e influência nos materiais de embalagens alimentares.

Objetivo	Propriedades	Resultados	Nanomaterial
Nanorreforço	Mecânicas	Aumento da força, rigidez e plasticidade	Nanotubos de carbono, “nanowhiskers” de celulose
		Melhorias na tensão máxima e alongamento na rotura	Nanocelulose, nanopartículas de TiO ₂ , SiO ₂ , nanofibras celulose, nanotubos de carbono, MMT
	Térmicas	Aumento da estabilidade térmica (maior temperatura de decomposição)	MMT
	Barreira a gases e água	Aumento da tortuosidade do caminho, dificultando a difusão de gases e água pela matriz polimérica	Nanocelulose, nanopartículas de TiO ₂ , SiO ₂ , nanofibras celulose, nanotubos de carbono, MMT
Desenvolver embalagem ativa / inteligente	Antimicrobianas	Induz a morte ou inibe o crescimento de células procariotas e eucariotas	MMT e nanotubo de carbono
		Eficaz contra microrganismos patogénicos e deterioradores (bactérias gram-positivas e gram-negativas)	Nanopartículas de metais (ouro, zinco, prata) e nanopartículas de óxidos metálicos
	Conservantes	Sequestrador de oxigénio	Nanopartículas de TiO ₂
		Sequestrador de etileno	Nanopartículas de TiO ₂ e de prata
	Embalagens inteligentes	Indicador de oxigénio	Nanopartículas de TiO ₂
		Deteção de microrganismos patogénicos e deterioradores	Anticorpos conjugados com nanomateriais

Adaptado de (Arfat, Benjakul, Prodpran, Sumpavapol, e Songtipya, 2014; Azeredo *et al.*, 2011; Bradley, Castle, e Chaudhry, 2011; Cushen *et al.*, 2012; Duncan, 2011; Marx e Barth, 2010; Mihindukulasuriya e Lim, 2014; Munteanu *et al.*, 2014; Reddy, Vivekanandhan, Misra, Bhatia, e Mohanty, 2013; Rhim e Ng, 2007; Sanuja, Agalya, e Umapathy, 2014; Silvestre *et al.*, 2011).

A unidade de repetição deste sistema multicamada é resultado da soma da espessura de uma lamela de argila (9,6Å) e do espaço ocupado pelo catião no interior das lamelas (espaço basal - d001) (Castel, 2012).

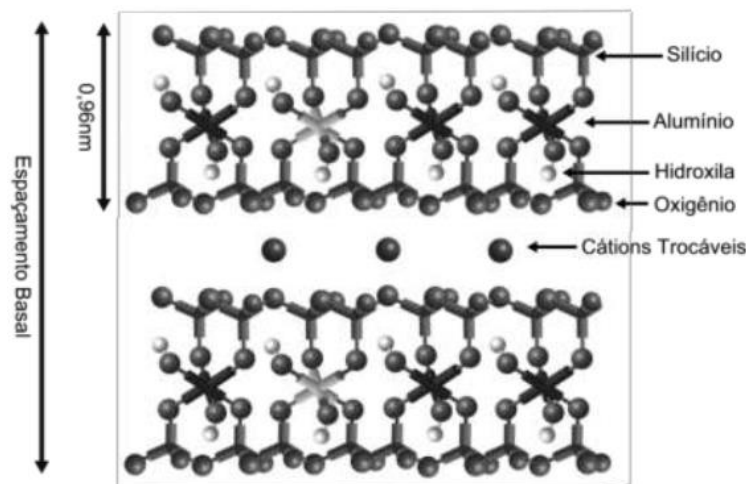


Figura 2.5. Estrutura da Montmorilonite (Castel, 2012).

O grande interesse atraído pela MMT na obtenção de nanocompósitos é devido à sua vasta disponibilidade (de origem natural, vasta gama de depósitos em todo o mundo), poder de intumescimento; plasticidade, capacidade de troca iônica, resistência mecânica, capacidade de delaminação (separação das camadas de argila), elevada superfície de contato (Castel, 2012; Kim e White, 2006; Silvestre *et al.*, 2011), transparência (espessura das camadas da MMT inferior ao comprimento de onda de luz visível) e resistência a solventes e temperaturas elevadas (Faria, Vercelheze, e Mali, 2012).

O caráter hidrofílico é, entretanto, um fator limitante na utilização deste material. Na sua forma natural as argilas MMT são incompatíveis com polímeros apolares (caráter hidrofóbico) e quando misturados geram aglomerados de argila (Azeredo *et al.*, 2011). Por meio do processo de organofilização é possível melhorar a compatibilidade entre MMT e polímeros apolares (Rhim e Ng, 2007).

O processo de organofilização consiste na modificação química por troca iônica dos cátions presentes dentro das galerias por cátions orgânicos (organofilização), geralmente sais de amônio (Paiva, Morales, e Díaz, 2008). Tal alteração além de aumentar o caráter hidrofóbico (orgânico) promove um distanciamento entre as camadas da argila, aumento da distância basal, o que resulta em

melhor interação e dispersão no polímero (Azeredo *et al.*, 2011; Paiva, Morales, e Guimarães, 2006; Rodríguez, Galotto, Guarda, e Bruna, 2012), condições necessárias para que ocorram as melhorias desejadas com o reforço das nanoargilas.

As melhorias das propriedades mecânicas e de barreira dos polímeros são alcançadas quando se obtém boa interação interfacial gerando boa compactação entre a nanoargila e a matriz polimérica (Coelho *et al.*, 2007; Silvestre *et al.*, 2011). Desta forma, a incorporação de argilas em polímeros pode resultar em três compósitos distintos, nomeadamente: estrutura tactóide (microcompósito), intercalada ou esfoliada (nanocompósito) (Henriette Monteiro Cordeiro Azeredo *et al.*, 2011). Quanto maior o grau de esfoliação das nanopartículas, maior será a eficiência do reforço e melhor desempenho é obtido (Cushen *et al.*, 2012; Goyal e Goyal, 2012) (Figura 2.7).

A melhoria das propriedades mecânicas e de barreira dos biopolímeros com a incorporação da MMT é explicada devido ao aumento da tortuosidade do caminho difusivo para permeantes, retardando o transporte gasoso através do material de embalagem (Figura 2.6) (Rhim e Ng, 2007).

Na estrutura tactóide, não ocorre a separação das camadas da argila, desta forma as partículas estão apenas dispersas na matriz polimérica formando microcompósitos. Nesta conformação a argila desempenha o papel de apenas um enchimento convencional, e os benefícios são limitados. A intercalação e esfoliação, por outro lado, resultam na produção de nanocompósitos. Enquanto no arranjo intercalado as cadeias do polímero se apresentam entre as camadas de silicato da argila, mantendo-se porém a organização do sistema na forma empilhada, já nos nanocompósitos esfoliados ocorre a completa esfoliação ou delaminação das camadas de silicato ao longo da matriz polimérica, o que resulta em melhorias mais significativas nas propriedades dos polímeros (Coelho *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2014; Faria *et al.*, 2012; Silvestre *et al.*, 2011).

A síntese dos nanocompósitos polímero/MMT pode ser realizada de diferentes formas, sendo três os principais métodos empregados: (i) método “solvent casting” ou método a frio com intercalação/esfoliação por solvente – mais

utilizado em biopolímeros devido à limitação das temperaturas de exposição (Rhim e Ng, 2007); (ii) polimerização “in situ” - Neste método, os monómeros do polímero interagem com a superfície do nanomaterial e formam uma suspensão uniforme (ultrassons podem ser utilizados para melhorar a dispersão) em seguida, um iniciador é adicionado ao sistema para iniciar a polimerização (também pode ser iniciado por luz, calor, etc.) (Lvov e Abdullayev, 2013); e (iii) extrusão (dispersão por fusão) (Paiva *et al.*, 2008; Silvestre *et al.*, 2011).

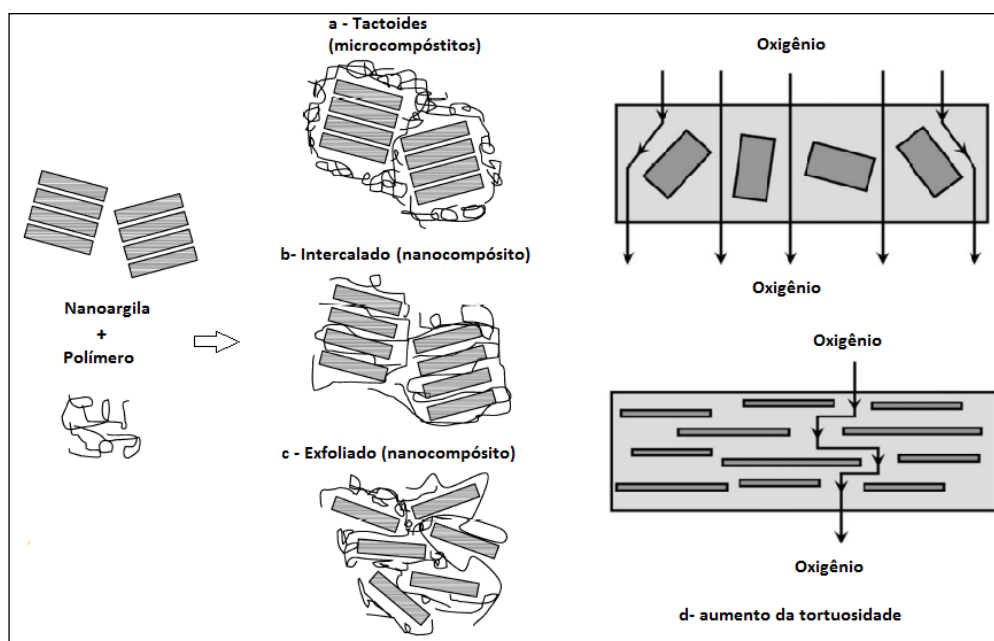


Figura 2.6. Interação nanoargila + polímero, estrutura: (a) tactoides (microcompósito); (b) intercalado (nanocompósito); e (c) esfoliado (nanocompósito). Aumento da tortuosidade devido a dispersão da MMT (d). Adaptado de (Rhim e Ng, 2007; Silvestre *et al.*, 2011).

Na metodologia evaporação de solvente (“casting”) são realizadas solubilizações do polímero e intumescimento da argila no mesmo tipo de solvente, posteriormente misturam-se as duas soluções para que haja interação e dispersão entre as duas fases. Ocorre o intercalamento das cadeias poliméricas dentro das camadas internas da argila por meio do deslocamento do solvente de dentro das lamelas da MMT (Rhim e Ng, 2007; Shen, Simon, e Cheng, 2002).

2.2.2. Quitosano

O quitosano (poli- β (1,4)-2-amino-2-desoxi-D-glucose) é um biopolímero de origem renovável obtido da desacetilação da quitina (poli(Nacetil-D-glucosamina)) encontrada em exoesqueletos de crustáceos e insetos e na parede

celular de fungos e microrganismos (Darder, Colilla, e Ruiz-Hitzky, 2003). Trata-se de um polissacárido, tido como o segundo mais abundante na natureza (Figura 2.7) (Assis e Alves, 2002).

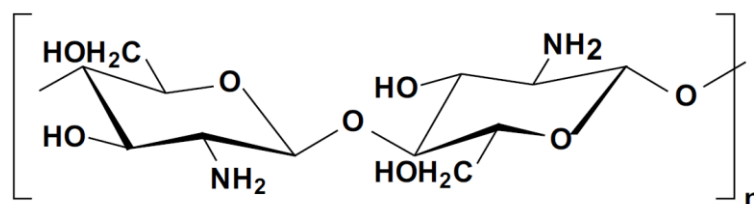


Figura 2.7. Estrutura básica do quitosano. n = grau de polimerização. (Assis e Alves, 2002)

O potencial do quitosano para utilização em filmes ativos para alimentos é devido às suas características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, capacidade de formar membranas, géis, fibras, partículas e filmes flexíveis de difícil rompimento e à sua ausência de toxicidade. Para além disso, este polissacárido possui atividade antimicrobiana, o que resulta num filme com funções ativas, interessante do ponto de vista de manutenção da qualidade e extensão da vida de prateleira dos produtos embalados (Abdollahi *et al.*, 2014; Dutta, Tripathi, Mehrotra, e Dutta, 2009; Melo *et al.*, 2012; Remya *et al.*, 2016; Santana *et al.*, 2013; Siripatrawan e Noipha, 2012).

Filmes ativos de quitosano incorporados com diferentes antioxidantes foram produzidos e aplicados em alimentos de forma satisfatória, retardando o processo oxidativo dos produtos embalados (Santana *et al.*, 2013; Siripatrawan e Noipha, 2012). Em ambos os trabalhos, a utilização das embalagens de quitosano retardaram o processo oxidativo dos alimentos embalados, independentemente dos filmes terem sido ou não incorporados com o agente ativo antioxidante. Este resultado é explicado pelo facto do quitosano ser um polissacárido que forma filmes com baixa permeabilidade ao oxigénio e com propriedades antioxidantes já relatadas.

A incorporação dos compostos antioxidantes estudados: urucum (Santana *et al.*, 2013) e extrato de chá verde (Siripatrawan e Noipha, 2012) contribuíram para retardar ainda mais o processo oxidativo, extendendo o tempo de prateleira dos alimentos avaliados, óleo de palma e salsicha de porco, respetivamente. Observou-se uma diminuição do índice de peróxidos no óleo com o aumento do

teor de urucum presente nos filmes ativos, assim como uma gradual diminuição dos polifenóis totais presentes nas embalagens ao longo do tempo, concluindo-se que os compostos fenólicos incorporados na embalagem sofreram oxidação ao invés do alimento e que houve uma gradual migração dos mesmos para o alimento acondicionado (Santana *et al.*, 2013). A estabilidade oxidativa das salsichas de porco foi avaliada por meio do teste TBARs (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Após 20 dias de acondicionamento os produtos apresentaram menores mudanças na cor, textura e valores de malondialdeído (MDA), assim como maior aceitação sensorial (as salsichas embaladas nos filmes ativos apresentaram rejeição sensorial apenas ao final de 24 dias de armazenamento, enquanto que a amostra de controle foi rejeitada no final do 12º dia – ganho de 100% na vida de prateleira). Estes resultados foram atribuídos aos efeitos antimicrobianos do quitosano e aos potentes antioxidantes presentes no extrato de chá verde (compostos fenólicos como catequinas, epicatequinas, galatos de catequina, galatos de epicatequinas, entre outros) que são eficientes estabilizadores de radicais livres (Siripatrawan e Noipha, 2012).

Dias (2012) desenvolveu um bio-nanocompósito à base de quitosano/MMT com incorporação de α -tocoferol, um antioxidante natural, para aplicação em salmão fresco. O alimento foi avaliado durante 8 dias quanto ao seu estado oxidativo (lipoperoxidação), cor e migração da vitamina adicionada. A incorporação de 10% de MMTNa⁺ pelo método “casting” resultou num nanocompósito exfoliado que apresentou redução na permeabilidade ao vapor de água e humidade de equilíbrio assim como aumento da hidrofobicidade da superfície. Do ponto de vista ótico, o material apresentou maior opacidade nos tratamentos com adição do antioxidante e maior bloqueio da radiação UV. Houve também melhorias nas propriedades mecânicas devido ao nanorreforço utilizado, os módulos de elasticidade e tensão máxima foram aumentados. O peixe embalado nos bio-nanocompósitos com 10% e 15% (v/p) de α -tocoferol apresentou valores da vitamina de 14 mg / g de salmão, o que foi suficiente para reduzir a lipoperoxidação, aumentando a vida de prateleira do produto embalado. Resultados demonstram a viabilidade e potencial de utilização destas tecnologias combinadas

(embalagens ativas x nanotecnologia) no desenvolvimento de novos materiais de embalagem para utilização no setor alimentar.

Apesar de já existirem na literatura trabalhos com quitosano incorporados com extratos naturais, como por exemplo filmes de quitosano incorporados com extratos de chá verde (Siripatrawan e Harte, 2010); óleo essencial de folhas de canela (Perdones, Vargas, Atarés, e Chiralt, 2014); carvacrol (López-Mata *et al.*, 2013); própolis (Siripatrawan e Vitchayakitti, 2016), entre outros, o presente estudo pretende dar um contributo para o avanço no conhecimento ao testar a incorporação de diferentes compostos bioativos no quitosano. O principal objetivo desta dissertação consiste, portanto, na otimização de uma formulação com nanorreforço que possa permitir o desenvolvimento de um material adequado para utilização como embalagem alimentar em produtos cárneos.

2.3. Legislação

Dentro da União Europeia (UE) existem várias diretrizes e regulamentos sobre materiais em contato com alimentos, cuja segurança é avaliada pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) (Tabela 2.4) (Ribeiro-Santos, de Melo, Andrade, e Sanches-Silva, 2017).

Nos Estados Unidos da América (EUA), o FDA é responsável pela regulação do MCA. Os materiais utilizados em aplicações de contato com alimentos são considerados aditivos indiretos para alimentos e estão regulamentados no Código de Regulamentações Federais (CFR), sob o Título 21 sobre Alimentos e Medicamentos (FDA, 2017).

Em alguns países da América do Sul, como por exemplo no Brasil, as regulamentações de embalagens são harmonizadas pelo MERCOSUL (Mercado Comum do Sul), que para fins regulatórios utiliza como referência os regulamentos para embalagens e materiais de contato com alimentos da União Europeia e do FDA, entre outros. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é a entidade responsável por regular, controlar e monitorizar as embalagens dos alimentos.

Alguns dos regulamentos adotados no Brasil e UE estão descritos na Tabela 2.4.

A migração de compostos da embalagem para o alimento embalado pode na maioria dos casos ser indesejada, podendo causar danos à saúde do consumidor devido à ingestão de substâncias indevidas (Azeredo, Faria, e Brito, 2012). No caso das embalagens ativas, tal migração é desejável, e objetiva a proteção do alimento embalado por meio da ação antimicrobiana ou antioxidante dos compostos migrados (Soares e Hotchkiss, 1998).

Tabela 2.4. Regulamentos aplicados em embalagens e materiais intencionalmente produzidos para contacto com alimento

Materiais	Tema	Legislação	
		Brasil	União Europeia
Geral	Materiais que entram em contacto com alimentos	RDC 91/2011	Regulamento (UE) 1935/2004
	Boas práticas de fabricação	RDC 275/2002	Regulamento (UE) 2023/2006
	Embalagens ativas e inteligentes	-	Regulamento (UE) 450/2009
	Estudos de migração em materiais plásticos e embalagens que entram em contacto com alimentos	RDC 51/2010	Regulamento (UE) 10/2011
	Lista de aditivos autorizados para uso em embalagens destinadas ao uso em alimentos	RDC 17/2008	Regulamento (UE) 10/2011
Plásticos	Artigos e materiais plásticos para uso em contacto com alimentos	RDC 105/1999	Regulamento (UE) 10/2011

*RDC = Resolução da Diretoria Colegiada; UE = União Europeia.

Desta forma, estudos de migração são fundamentais para garantir a segurança dos alimentos, uma vez que alguns dos possíveis compostos difundidos da embalagem (desejáveis ou não) podem estar em concentrações superiores aos limites aceitáveis, e colocar em risco a saúde humana (Chungy, Papadakis, e Yamy, 2002; Souza e Fernando, 2016). Uma avaliação dos riscos originados pela migração de substâncias do material em contacto com alimentos para alimentos e os requisitos são regulamentados, na UE, ao abrigo do Regulamento (UE) n.º 1935/2004.

Tais ensaios devem ser realizados sob condições de tempo e temperatura de acordo com as características do alimento (particularmente o teor de gordura e estado físico), seu uso e armazenagem, bem como a concentração de migrantes nas embalagens e no tipo de embalagem (Brasil, 2010; European Commission, 2011).

A quantificação dos teores migrados diretamente no alimento após o contato com um material de embalagem é o método mais indicado (Souza e Fernando, 2016, Souza, Ribeiro-Santos *et al.*, 2018). Entretanto, devido à complexidade dos alimentos estas medidas podem tornar-se inviáveis (Silva, Freire, García, Franz, e Losada, 2007). De modo a contornar tal dificuldade, simuladores alimentares estão autorizados a serem usados em testes de migração. Estes compostos têm propriedades físico-químicas semelhantes aos alimentos e imitam o seu comportamento (Brasil, 2010; European Commission, 2011), permitindo simplificar a identificação e quantificação dos compostos difundidos das embalagens.

As condições dos testes de migração (simuladores de alimentos, tempo e temperatura de contato) devem seguir os procedimentos legais implementados para cada país ou grupo de países e os limites de migração estabelecidos em cada país devem ser respeitados, a fim de garantir a saúde do consumidor (Sanches-Silva *et al.*, 2014). De acordo com o Regulamento (UE) n.º 10/2011 da Comissão Europeia, podem ser utilizados vários simuladores alimentares, nomeadamente: Etanol 10% ou 20% (v / v) e ácido acético 3% (p / v) são atribuídos para alimentos que têm um carácter hidrofílico e são capazes de extrair substâncias hidrofílicas. O ácido acético deve ser utilizado para os alimentos cujo pH seja inferior a 4,5 e o etanol 20% (v / v) para alimentos alcoólicos com um teor de álcool até 20% e para os alimentos que contenham uma quantidade relevante de ingredientes biológicos que os tornem mais lipofílicos. Etanol 50% (v / v) e óleo vegetal são atribuídos para alimentos que têm um carácter lipofílico e são capazes de extrair substâncias lipofílicas. Etanol a 50% deve ser utilizado para alimentos alcoólicos com teor alcoólico acima de 20% e para emulsões óleo em água. O óleo vegetal deve ser utilizado para alimentos que contenham gorduras livres à superfície. Poli (óxido de 2,6-difenil-p-fenileno) é atribuído para testar a

migração específica em alimentos secos. Nos testes de migração, a amostra deve ser colocada em contacto com o simulador alimentar de uma forma que represente a pior das condições previsíveis de uso, com o tempo e temperatura de contato e limites de migração global definidos no Regulamento (UE) n.º 10/2011. Migração total ou global é definida como a totalidade de componentes transferidos dos materiais em contato com alimentos para alimentos ou para os simuladores sob as condições usuais de uso, preparação e armazenamento ou sob condições de teste equivalentes. O limite de migração específica é a quantidade máxima permitida de uma substância específica transferida do material de contacto com alimento para o alimento ou para os simuladores que não representa um risco para a saúde (Brasil, 2010; European Commission, 2011).

3

Material e Métodos

3.1. Metodologia geral

O trabalho foi desenvolvido no Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, em Portugal. O procedimento experimental foi dividido em quatro grandes blocos: (i) definição dos extratos a serem utilizados e escolha das argilas; nesta etapa diferentes óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos (EHA) foram avaliados em termos da sua bioatividade e três diferentes argilas em termos da sua interferência nas propriedades do quitosano; (ii) após definição dos dois extratos naturais e da argila com melhores propriedades, os filmes foram produzidos e caracterizados com o objetivo de avaliar a interferência do agente antioxidante e do nanorreforço nas propriedades funcionais do polímero; para tal, foram realizadas análises colorimétricas, de humidade, intumescimento, solubilidade em água, permeabilidade ao oxigénio e ao vapor de água, propriedades mecânicas, espectroscopia no infravermelho, difração de raios-X, microscopia de força atómica (MFA), microscopia eletrónica de transmissão (MET) e microscopia eletrónica de varrimento (MEV); (iii) as propriedades ativas dos filmes foram determinadas por meio de ensaios de difusão num simulador alimentar e de atividade antioxidante e antimicrobiana “in vitro”, e por último os filmes foram utilizados como embalagem primária para produtos cárneos (carne de frango crua)

e foi feito o acompanhamento da vida de prateleira por meio de análises do efeito do filme na preservação da oxidação lipídica, através da determinação das substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico, além das análises físico-químicas (pH, acidez, humidade e cor) e microbiológicas.

Os resultados e discussão foram divididos em três capítulos, nomeadamente: (a) capítulo 4 – escolha dos melhores extratos naturais e montmorilonite; (b) capítulos 5 e 6 – bio-nanocompósito quitosano / montmorilonite incorporados com os extratos que conferiram ao quitosano mais atividade.

3.2 Materiais

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau pureza analítico e a água purificada com o sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). As nano-argilas MMT Cloisite®Na⁺, Cloisite®Ca⁺ e Cloisite®20 foram oferecidas pela *BYK Additives e Instruments* (USA). O quitosano (com 75% de desacetilação e elevado peso molecular 31-37 kDa), etanol absoluto, radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH), radical 2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), persulfato de potássio, Trolox (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano), e 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) foram comprados na Sigma Aldrich (Alemanha). Glicerol, ácido gálico, ácido acético glacial, acetona, brometo de sódio (NaBr), acetato de potássio (CH₃COOK - 99% pureza), fenolftaleína, hidróxido de sódio (NaOH), e tween 80 (polisorbato 80) foram fornecidos pela Alfa Aesar (Alemanha). Enquanto que o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), reagente de Folin-Ciocalteu, cloreto de sódio, carbonato de sódio anidro, ácido tricloroacético (TCA) foram adquiridos à PanReac (Espanha). Dimetil sulfóxido (DMSO) produzido pela Fisher Scientific (USA). Os reagentes utilizados nos ensaios de microbiologia foram comprados da Biokar (França), nomeadamente: *tripto-casein soy broth* (TSB), *tripto-casein agar* (TSA), *brain heart infusion agar* (BHI), *plate count agar* (PCA), *mueller hinton agar* (MHA) e caldo verde brilhante.

Os compostos ativos foram adquiridos num mercado local: cinco diferentes óleos essenciais (OE) de grau alimentar (Biover, Bélgica), nomeadamente óleo essencial dos rizomas de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) (OEG); óleo essencial de alecrim (OEA) (*Rosmarinus officinalis* L. ct. camphor); óleo

essencial de salva (OES) (*Salvia lavandulifolia* Vahl); óleo essencial de melaleuca (OEM) (*Melaleuca alternifolia* (Maiden e Betchel) Cheel); e óleo essencial de tomilho (OET) (*Thymus zygis* Loefl. ex L. ct. linolol). Foram ainda adquiridas plantas desidratadas: chás preto e verde (*Camelia sinensis* (L.) Kuntze)) proveniente dos Açores (Gorreana, Portugal), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), salva (*Salvia officinalis* L.), e folhas de Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) da variedade *Everglades* 41, colhidas em setembro de 2005, antes da floração (que ocorre entre 14 –17 de outubro), provenientes dos campos experimentais de kenaf na Caparica (latitude 38°40'03"N, longitude 9°12'8"W, altitude 50 m), Portugal.

3.3. Seleção do extrato natural

Para determinar quais os melhores extratos naturais a serem utilizados nos filmes ativos deste trabalho, foram testados diferentes extratos hidroalcoólicos (Kenaf, chás verde e preto da região dos Açores Portugal, alecrim, salva e gengibre) e óleos essenciais (alecrim, salva, tomilho, melaleuca e gengibre).

Os óleos essenciais foram utilizados no formato fornecido pelo fabricante, enquanto que os extratos hidroalcoólicos foram produzidos de acordo com método descrito no subitem 3.3.1.

3.3.1. Preparação dos extratos hidroalcoólicos

Os extratos hidroalcoólicos foram produzidos por meio de extração sólido-líquido utilizando-se etanol 50% (v/v) e um banho ultrassônico de acordo com as metodologias descritas por Turkmen *et. al* (2006) e Pascoal *et. al* (2015) e com as modificações introduzidas por Souza *et. al* (2017). Previamente ao processo de extração, todas as plantas foram moídas em moinho elétrico (ProfiCook modelo KSW 1021, Alemanha) de modo a aumentar a superfície de contacto com o solvente e otimizar o processo de extração dos compostos fenólicos. Resumidamente, 5 g de cada planta, pesados em balança analítica Mettler Toledo (modelo AB204, Suíça), foram misturados com 50 mL de etanol 50% (v/v) usando o ultraturrax® (Modelo IKA®T18, Alemanha). A mistura foi então mantida sob refrigeração (5 °C ± 2 °C) ao abrigo de luz durante aproximadamente 24 h, sendo

submetida a ultrassons durante 30 min / 50 Hz em banho ultrassónico (Selecta, Barcelona, Espanha). O sistema foi centrifugado durante 30 min a 4 °C com força de 10000 g (Sigma modelo 4K15, Alemanha), e o sobrenadante removido, sendo o processo repetido novamente. Os sobrenadantes combinados de ambas extrações foram filtrados em papel de filtro Whatman n° 4, e concentrados em rota vapor (Büchi modelo R-200, Suíça) a 40 °C (em banho aquecimento - Büchi modelo B-490, Suíça) até volume final de 25 mL, os extratos foram mantidos a -18 °C até utilização. Obtiveram-se os extratos hidroalcoólicos de gengibre (EHA_G), alecrim (EHA_A), salva (EHA_S), chá verde (EHA_CV), chá preto (EHA_CP) e kenaf (EHA_K).

3.4. Preparação dos filmes

O procedimento básico para a produção dos filmes foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Siripatrawan e Harte (2010) e Dias *et. al* (2014). Para solubilização do quitosano e produção da suspensão filmogénica (SF), 1,5 g do polissacárido foi dissolvido em 100 mL de solução de ácido acético glacial 1% (v/v) sob agitação constante, à temperatura ambiente, 20 °C \pm 5 °C, por 24 horas. Adicionou-se glicerol (função plastificante) na proporção de 30% (m/m quitosano) (Siripatrawan e Harte, 2010) a todas as amostras. Em seguida, a MMT (2,5% m/m quitosano) foi adicionada ao sistema e ciclos de agitação mecânicos foram realizados com o objetivo de se alcançar a melhor interação e exfoliação da nanoargila com o quitosano. O processo de exfoliação consistiu em três ciclos compostos por cinco minutos de agitação em ultraturrax® seguidos de 15 minutos em banho ultrassónico (50 Hz). Obtiveram-se desta forma os bio-nanocompósitos Qui/MMT.

Para a primeira etapa dos ensaios, na escolha dos melhores extratos naturais, a partir da SF foram incorporados 30% de glicerol e 1% (v/v da SF) dos cinco OEs (óleo de alecrim, gengibre, tomilho, melaleuca e salva) ou seis EHAs (chá verde, chá preto, alecrim, gengibre, kenaf e salva) testados. Para os filmes incorporados com OEs, foi ainda adicionado 0,2% (v/v OE) de tween 80 como agente emulsionante (Abdollahi, Rezaei, e Farzi, 2012b). O sistema foi submetido a um ciclo de agitação, igual ao utilizado no processo de exfoliação da

nanoargila, e em seguida verteram-se as misturas para formas de vidro (18x25 cm) que foram posteriormente deixadas a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ para secagem natural (entre 48-72 horas). Ensaios de migração, atividade antioxidante dos compostos difundidos para o meio simulador, e algumas caracterizações físicas dos filmes (propriedades óticas e mecânicas, espessura, índice de intumescimento, solubilidade em água e teor de água) foram utilizados como parâmetros para seleção dos dois melhores extratos a serem usados nas etapas seguintes do trabalho. Todas as metodologias utilizadas serão descritas posteriormente.

Na definição da melhor MMT foram testadas três diferentes argilas comerciais: Cloisite[®]Na⁺, Cloisite[®]Ca²⁺, Cloisite[®]20, as quais serão referenciadas como MMTNa, MMTCa e MMT20, respetivamente. A partir da SF as MMTs foram incorporadas sempre na proporção de 2,5% (m/m quitosano) e seguiu-se o procedimento de exfoliação. Os bio-nanocompósitos Qui/MMT foram então vertidos em formas redondas (24 cm de diâmetro) de metal revestidas com politetrafluoretileno (teflon[®]) e deixados secar a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48-72 horas. A definição da percentagem de MMT baseada no estudo de Wang *et al.* (2005), que verificaram que percentagens superiores a 5% de nanoargilas diminuem a interação e esfoliação do nanomaterial com a cadeia polimérica do quitosano. A seleção da melhor MMT foi baseada em ensaios de caracterização realizados para verificar o nível de esfoliação e melhoria nas propriedades funcionais alcançados (por meio de difração de raio-X, análises mecânicas, cor, transparência e opacidade, humidade, intumescimento e solubilidade em água, análise calorimétrica diferencial de varrimento), de acordo com as metodologias descritas posteriormente.

Desta primeira etapa, a melhor MMT e os extratos que conferiram ao quitosano maior atividade foram escolhidos para seguimento das experiências. Novos filmes de quitosano incorporados com 0% ou 2,5% da melhor argila e diferentes proporções do respetivo extrato natural (0%, 0,5%, 1% e 2%) foram produzidos seguindo-se o procedimento básico. O extrato natural foi incorporado apenas antes do último ciclo de agitação, e os bio-nanocompósitos vertidos para as mesmas formas de vidro utilizadas na produção dos filmes incorporados com os diferentes extratos naturais e submetidos ao mesmo processo de secagem.

Filmes de quitosano sem incorporação de MMT ou extrato natural foram produzidos utilizando-se o mesmo procedimento, com apenas um dos ciclos de agitação, e definidos como controlo em todas as etapas realizadas.

3.5. Caracterização dos filmes

3.5.1. Difratometria de Raios-X (DR-X)

Por meio da técnica de difração de raios-X é possível verificar o nível de exfoliação das argilas entre as cadeias poliméricas do quitosano, concluindo entre uma esfoliação total, parcial ou não esfoliação. A melhoria das propriedades mecânicas, de barreira e térmicas estão intimamente relacionadas com o grau de esfoliação do nanorreforço, sendo tal determinação primordial para se explicar o comportamento dos bio-nanocompósitos, assim como as outras análises de caracterização do material.

Amostras dos filmes e das argilas puras foram analisados num difratômetro com radiação de cobre ($\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) a 40 KV, corrente de 30 mA, sob ângulo 2θ variando de 5° a 40° com intervalo de passo de $0,02^\circ$. Os pós das argilas foram prensados a frio num molde cilíndrico (diâmetro de 13 mm) utilizando uma prensa hidráulica uniaxial (Specac-Atlas™ 15T, Specac Ltd., Reino Unido). As amostras em forma de pastilha foram então colocadas num suporte de metal, que por sua vez foi inserido no difratômetro. Enquanto que os filmes foram montados sobre bolachas de silício de modo a garantir sua planura e inseridos no difratômetro. Os espaçamentos “d” da montmorilonite e dos filmes nanocompósitos foram calculados a partir da equação de *Bragg* (Eq. 1) (Cullity, 1978, Rhim, Hong, Park, Ng, e Erry, 2006).

$$\lambda = 2d \sin \theta \quad (1)$$

Onde λ é o comprimento de onda da radiação de raios-X utilizado, d é o espaçamento interplanar basal e θ é o ângulo de difração medido (Cullity, 1978).

3.5.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Esta análise é baseada no facto das ligações químicas presentes na amostra possuírem frequências vibracionais específicas. Assim sendo, a frequência de absorção da radiação no infravermelho é característica de cada tipo de ligação, permitindo a identificação das interações entre a matriz polimérica e os compostos incorporados nos nanocompósitos (Barbosa, 2007). Espera-se que por meio desta técnica sejam identificadas as possíveis interações entre as cadeias poliméricas dos polímeros com os compostos fenólicos dos extratos, assim como com a Montmorilonite.

Os espectros foram obtidos seguindo metodologia descrita por Siripatrawan e Harte (2010) utilizando espectrofotómetro infravermelho modelo PerkinElmer *spectrum* Two (Perkin Elmer, USA). Foi utilizado o FT-IR em ATR (“Attenuated total reflectance” – refletância total atenuada) com 32 varrimentos e 1 cm^{-1} de resolução na faixa de comprimento de onda de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} .

3.5.3. Caracterização morfológica dos nanocompósitos

Análises morfológicas utilizando microscopia são decisivas para a avaliação da interação dos componentes dos bioplásticos desenvolvidos. Nas imagens e cortes é possível verificar homogeneidade ou não do material.

A caracterização morfológica dos filmes foi realizada mediante microscopia eletrónica de varrimento (MEV), microscopia de força atómica (MFA) e microscopia eletrónica de transmissão (MET).

As fotomicrografias da superfície e da secção transversal dos filmes foram feitas utilizando-se a técnica MEV no Departamento de Ciência dos Materiais (DCM/FCT) da Universidade Nova de Lisboa. Foram observadas amostras dos tratamentos controlo (filme de quitosano puro), Qui+MMT, e os filmes incorporados com o maior teor dos dois melhores extratos naturais com ou sem adição da MMT.

Amostras dos filmes foram fixadas no suporte de porta-amostras do microscópio (*stub*), com auxílio de fita de carbono, e recobertas com fina camada de ouro e, então, observadas e fotografadas em várias magnificações em Microscópio Eletrónico de Varrimento Zeiss (Modelo DSM 962), para visualização da secção transversal e da superfície dos filmes.

A observação da homogeneidade e topografia da superfície dos filmes foi realizada por meio da análise de MFA. As imagens foram realizadas no Departamento de Química (DQ/FCT) da Universidade Nova de Lisboa. Os ensaios foram realizados nos mesmos tratamentos observados pela MEV.

A microscopia das amostras foi feita com filmes sem preparação montados num suporte metálico. O microscópio de força atómica utilizado foi o TT-AFM (AFM workshop - EUA). As imagens foram obtidas em “tapping mode” (vibracional) com pontas de Nitreto de silício (App nano), com 516 linhas e 0,5Hz de frequência de varrimento.

As imagens foram realizadas com diferentes dimensões 40 μm , 20 μm , 10 μm , 5 μm e 2 μm de lado mas foram escolhidas as imagens de 40 μm por serem mais representativas do aspeto global dos filmes.

De modo a verificar a estrutura e esfoliação da argila, foram realizadas imagens em MET dos filmes incorporados com a maior concentração dos melhores extratos naturais e com a MMTNa. O ensaio foi realizado no Centro de Microscopia Eletrónica e Histopatologia Egas Moniz.

As amostras foram preparadas por meio de um processo de impregnação, onde as mesmas ficaram em contacto com a resina de impregnação por 5 dias previamente ao processo de polimerização (secagem). Os blocos resultantes contendo as amostras foram submetidos a cortes em ultramicrotomos que foram coletados em grelhas e levados para observação no microscópio eletrónico de transmissão JEOL (JEM-1200EX, EUA).

3.5.4. Análises térmicas

As propriedades térmicas dos filmes foram analisadas através das análises calorimétrica diferencial de varrimento (DSC) e termo gravimétrica (TGA),

utilizando-se os equipamentos DSC (DSC 204 F1 Phoenix®, Netzsch, Alemanha) e PerkinElmer STA 6000 “Simultaneous Thermal Analyzer” (Alemanha), respectivamente.

A temperatura de transição vítrea (T_g) dos filmes foi determinada em DSC. Amostras de filme com aproximadamente 10 mg foram acondicionadas em panela de alumínio, seladas e submetidas ao ciclo de aquecimento (20 °C até 350 °C) a uma taxa constante de 20 °C·min⁻¹ sob atmosfera de azoto (fluxo 50 mL·min⁻¹) (Woranuch e Yoksan, 2013).

Na análise termo gravimétrica, sob atmosfera de azoto, cerca de 10 mg de cada filme foram aquecidos até 900 °C a uma taxa de 10 °C·min⁻¹ e mantidos em isoterma por três minutos (Higueras, López-carballo, Cerisuelo, e Gavara, 2012). As temperaturas de decomposição dos compostos foram medidas a partir da primeira derivada da perda de massa (%) (DTGA) “versus” temperatura.

3.5.5. Avaliação da espessura e das propriedades mecânicas

A espessura é uma característica primordial quando se trata do desenvolvimento de materiais para embalagem, por estar diretamente relacionada com as demais propriedades da embalagem, como por exemplo propriedades mecânicas e de barreira. Desta forma, a sua determinação é necessária e fundamental para caracterização do material.

A espessura dos nanomateriais foi medida com auxílio de um micrómetro digital Mitutoyo em dez pontos aleatórios de duas amostras de cada filme em três repetições (Camilloto, 2009).

As propriedades mecânicas dos filmes (resistência máxima à tração, módulo de elasticidade e percentagem de alongamento) foram determinadas utilizando-se a máquina universal de testes Shimadzu Autograph (Shimadzu, Austrália), equipada com célula de carga de 0,5 kN, de acordo com a ASTM D882–12 (ASTM - America Society Standard Testing and Materials, 2012). Cinco corpos de prova de cada repetição/tratamento com dimensões de 150 x 25 mm foram avaliados utilizando-se velocidade de separação das garras de 50 mm·min⁻¹ e distância inicial de 50 mm. Devido à sensibilidade dos filmes à

mordedura das garras, os corpos de prova foram fixados nas garras do equipamento com auxílio de uma chapa de alumínio e um elástico como pode ser observado na Figura 3.1.

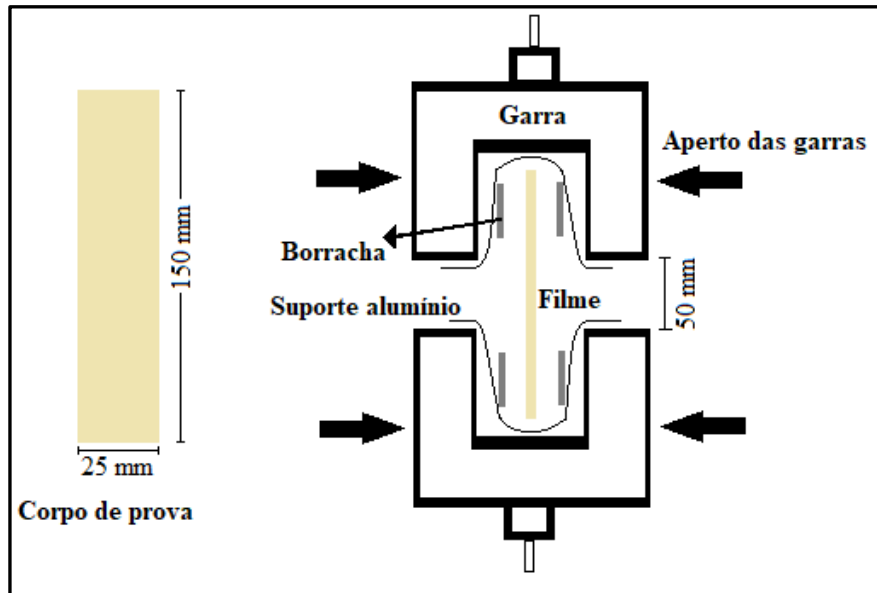


Figura 3.1. Montagem do filme nas garras utilizadas no ensaio de tração.

Os parâmetros mecânicos foram calculados a partir das curvas da força versus deformação (Fig. 3.2), onde a tensão máxima corresponde a força máxima antes do rompimento dividida pela área de atuação da tração, o módulo de elasticidade à inclinação da reta e a percentagem de alongamento é a razão entre o alongamento máximo e a distância inicial entre as garras (Sarantópoulos *et al.* 2002).

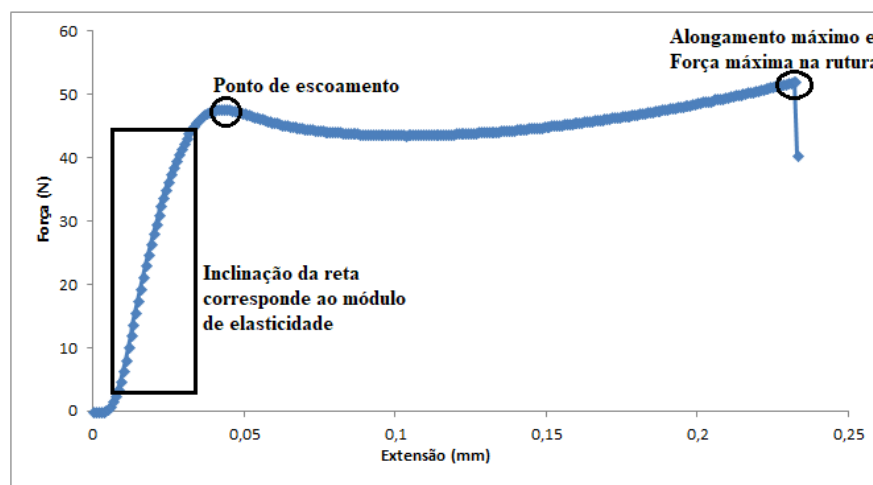


Figura 3.2. Exemplo de curva de ensaio de tração (Força x Extensão).

3.5.6. Avaliação das propriedades óticas

A cor é um parâmetro importante no desenvolvimento de novos filmes, uma vez que pode inferir na aceitabilidade do produto. Como o objetivo deste trabalho é incorporar diferentes extratos (de diferentes cores e intensidades) em quitosano, é esperado que haja variação de cor nos materiais desenvolvidos em relação ao material original. Desta forma, foram determinadas as propriedades óticas para avaliar como os extratos interferem na cor, opacidade e transparência dos biopolímeros.

As propriedades óticas foram avaliadas por meio da medida dos parâmetros L, a*, b*, e da opacidade. A análise foi conduzida de acordo com a escala de cor CIELab, onde L* é a medida de luminosidade, variando de zero (preto) a 100 (branco); a* a cromaticidade do verde (-60) a vermelho (+60); e b* a cromaticidade do azul (-60) para amarelo (+60), utilizando o colorímetro Minolta (CR 400/410, Japão) com fonte de luz D 65, e ângulo visual de 10°. A partir das coordenadas L*, a* e b* foram calculados o ângulo de hue (hue*) e a cromaticidade utilizando as equações 2-4 e 5 respectivamente.

$$hue^* = \arctan \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \times \frac{180}{\pi}, \text{ se } a^* > 0 \text{ e } b^* > 0 \quad (2)$$

$$hue^* = \arctan \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \times \frac{180}{\pi} + 180, \text{ se } a^* < 0 \quad (3)$$

$$hue^* = \arctan \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \times \frac{180}{\pi} + 360, \text{ se } a^* > 0 \text{ e } b^* < 0 \quad (4)$$

$$cromaticidade = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (5)$$

A opacidade foi determinada por meio da leitura direta da absorvância de amostras retangulares de cada tratamento. Utilizou-se espectrofotômetro UV/VIS (Modelo Spekol 1500, Analytikjena, Alemanha), no comprimento de onda de 600 nm, e o cálculo foi feito pela equação 6 (Park e Zhao, 2004).

$$\text{Opacidade} = \text{Absorvância (600 nm)} / \text{espessura do filme} \quad (6)$$

Espectros de varrimento no intervalo de comprimento de onda entre 190 nm a 900 nm também foram realizados a partir da leitura direta de amostras dos filmes em espectrofotômetro UV/VIS, tendo o ar como referência, e os resultados

expressos em percentagem de transmitância (Kanatt *et al.*, 2012).

3.5.7. Ângulo de contacto

O ângulo de contacto é um indicador da hidrofobicidade / hidrofiliidade de filmes (Dias *et al.*, 2014).

A determinação do ângulo de contacto foi realizada utilizando-se um goniómetro (KSV *Instruments* Ltd., CAM 100, Finlândia) e o *software* KSV CAM 100. Foram realizadas dez medições consecutivas (uma por segundo) do ângulo de contato de uma gota de água com a superfície dos filmes avaliados. As medidas foram realizadas a uma temperatura entre 20 °C e 22 °C, e as médias dos ângulos em ambos os lados da gota foram tidos como resultado (Ferreira *et al.*, 2016).

3.5.8. Determinação da humidade, solubilidade e índice de intumescimento

Por meio da determinação da humidade, solubilidade e índice de intumescimento é possível determinar o comportamento dos filmes em meio aquoso. Desta forma, trata-se de um indicativo da hidrofiliidade dos mesmos, uma característica importante pois a embalagem terá contacto direto com alimentos, que podem conter elevados teores de água.

Para determinação da humidade base húmida (b.h.), solubilidade e índice de intumescimento (II) dos filmes, amostras em duplicado foram cortadas (2 x 2 cm), pesadas (M1) em balança analítica (precisão 0,0001 g) e submetidas à secagem em estufa com circulação de ar (WTB *binder*, Alemanha) a 70 °C por 24 h. Após evaporação da água presente nas amostras, realizou-se uma segunda pesagem das mesmas e obteve-se a massa seca inicial (M2). Posteriormente, os filmes foram colocados em placas de Petri contendo 30 mL de água destilada. As placas foram fechadas e armazenadas durante 24 h à temperatura ambiente (20 °C \pm 5 °C). Após este período, removeu-se a água residual das placas e as amostras foram secas superficialmente com papel prosseguindo-se uma terceira pesagem (M3). As amostras foram novamente levadas a estufa com circulação de ar (70 °C por 24 h) para determinação da massa seca final (M4). A humidade,

solubilidade e índice de intumescimento foram calculados usando as equações 7,8 e 9 (Pastor *et al.*, 2013; Peng e Li, 2014):

$$\text{Humidade b. h. (\%)} = \frac{(M_1 - M_2)}{M_1} \times 100 \quad (7)$$

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{(M_2 - M_4)}{M_2} \times 100 \quad (8)$$

$$\text{II (\%)} = \frac{(M_3 - M_2)}{M_2} \times 100 \quad (9)$$

3.5.9. Avaliação das propriedades de barreira ao vapor de água e oxigênio

Películas plásticas são amplamente utilizadas como embalagens primárias no ramo alimentar. Entre as principais propriedades funcionais de interesse para a indústria alimentar podem citar-se a capacidade de bloquear gases (oxigênio) e vapor de água, uma vez que tais componentes têm interferência direta na manutenção da qualidade dos produtos embalados. Desta forma, a caracterização das propriedades de barreira é de extrema importância para avaliar como os aditivos incorporados no biopolímero modificam as permeabilidades, e concluir qual o melhor tratamento a utilizar numa aplicação futura.

A permeabilidade do vapor de água (PVA) (mol/m·s·Pa) foi obtida utilizando o método gravimétrico descrito por Ferreira *et. al* (2016) a 30 °C. Amostras de cada filme foram seladas no topo de células de vidro (45 mm diâmetro) contendo 8 mL de solução sobressaturada de NaCl (humidade relativa (HR) = 76,9%). As células foram então colocadas dentro de exsicadores contendo a solução sobressaturada de CH₃COOK (HR = 22,5 %) e equipados com uma ventoinha para promover a circulação do ar, mantendo a força motriz constante durante todo o teste. Previamente ao ensaio, os filmes foram equilibrados num exsicador contendo solução sobressaturada de NaCl (HR = 76,9%) a 30 °C. A temperatura e humidade relativa do ar dentro dos exsicadores foram monitorizadas durante todo o teste utilizando um termo-higrómetro (Vaisala, Finlândia). O fluxo de vapor de água foi determinado por meio da pesagem das células em intervalos de tempos regulares durante aproximadamente 22 h, e a PVA foi calculada utilizando-se a equação 10:

$$PVA = \frac{N_w \times \delta}{\Delta P_{w.eff}} \quad (10)$$

Onde: N_w (mol/m²·s) corresponde ao fluxo de vapor de água, δ (m) à espessura do filme e $\Delta P_{w.eff}$ (Pa) à força motriz efetiva. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão de três réplicas.

A permeabilidade do oxigénio (PO) foi determinada de acordo com metodologia descrita por Ferreira *et. al* (2016) utilizando-se uma célula de aço inoxidável com duas câmaras idênticas separadas pela película do teste. Antes dos testes, os filmes foram equilibrados a 30 °C e HR = 55% \pm 5% (exsicador contendo solução sobressaturada de NaBr). A PO foi determinada por meio da pressurização de um lado das câmaras (alimentação) com 0,7 bar de oxigénio (99.999% pureza) (Praxair, Espanha), seguido da medida da pressão em ambos compartimentos da célula ao longo do tempo, utilizando-se dois transdutores (Jumo, modelo 404327, Alemanha). O sistema foi mantido dentro de aquários contendo água com temperatura controlada a 30 °C (Julabo, modelo EH, Alemanha). A permeabilidade ao oxigénio foi calculada utilizando-se a equação 11.

$$\frac{1}{\beta} \ln \left(\frac{\Delta p_0}{\Delta p} \right) = P \frac{t}{\delta} \quad (11)$$

Onde Δp (mbar) corresponde à diferença de pressão entre a câmara de alimentação e a do permeado, P (mol·m/m²·s·Pa) à permeabilidade ao oxigénio, t (s) ao tempo, δ (m) à espessura dos filmes e β ao parâmetro geométrico da célula calculado utilizando-se uma membrana de poli(dimetilsiloxano) (PDMS) de acordo com metodologia descrita por Alves, Costa, e Coelho, (2010).

3.6. Caracterização das propriedades ativas do filme

3.6.1. Atividade antimicrobiana “in vitro” - Teste de difusão em agar

A atividade antimicrobiana dos óleos de alecrim e gengibre e dos biopolímeros foi determinada por meio do teste de difusão em agar (Nouri, Yarak, Ghorbanpour, Agarwal, e Gupta, 2017) para uma variedade de bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* (ATCC8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027), *Salmonella enterica* (ATCC10708)); gram-positivas (*Bacillus*

cereus (ATCC11778), *Enterococcus faecalis* (ATCC29212), *Listeria monocytogenes* (ATCC15313), *Staphylococcus aureus* (ATCC6538)); e uma levedura *Candida albicans* (ATCC10231). Os microrganismos avaliados foram escolhidos por serem patogênicos associados aos alimentos ou por estarem envolvidos nos processos deterioração.

Os microrganismos foram inoculados em TSA ou BHI (utilizado apenas para *L. monocytogenes*) e incubados nas respectivas temperaturas ótimas de crescimento (30 °C para o *B. cereus* e *C. albicans* e 37 °C para os demais microrganismos) por 16-24 h para as bactérias ou 48 h para a levedura.

Em seguida, colônias isoladas foram transferidas para solução salina estéril (0,85% NaCl) e a turbidez da suspensão foi ajustada utilizando-se um densímetro (Mc-Farland *desitometer* Modelo Den-1B, *Grant Instruments*, Inglaterra) para coincidir com o padrão de turbidez 0,5 McFarland, que corresponde a uma concentração de 1×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL e 1×10^6 UFC/mL para as bactérias ou levedura, respectivamente. O teste de difusão em agar foi realizado em placas (8,5 cm de diâmetro) contendo agar Mueller-Hinton. As placas foram inoculadas com o auxílio de zaragatoas previamente humedecidas nas respectivas suspensões microbianas.

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos OEs, efetuaram-se poços de 6 mm de diâmetro onde se aplicaram 50 µL de cada óleo. Para a levedura, testaram-se os óleos sem diluição e diluídos em DMSO (1:1). Para avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes, colocaram-se discos ($\varnothing = 6$ mm) dos filmes com os diferentes tratamentos na superfície do agar previamente inoculado com os diversos microrganismos. De modo a permitir a difusão dos compostos bioativos do filme, as placas foram mantidas durante 24 h em refrigeração ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) antes de serem colocadas na estufa a 37 °C ou 30 °C (dependendo do microrganismo) por 20 h ou 48 h. DMSO (no ensaio dos óleos essenciais), discos de papel estéreis e de películas comerciais (cloreto de polivinilo – PVC) foram utilizados como controlo negativo.

A ausência de crescimento microbiano à volta do disco/poço ou sob os filmes foi considerada como resultado positivo para a atividade antimicrobiana.

3.6.2. Atividade antimicrobiana “in vitro” – Método contagem unidades formadoras de colónias

De forma a complementar o estudo da atividade antimicrobiana, foi também realizado para os bio-nanocompósitos desenvolvidos o método da contagem de unidades formadoras de colónias (ASTM, 2001; Nouri *et al.*, 2017) para duas bactérias *S. enterica* (ATCC10708) e *B. cereus* (ATCC11778). Inicialmente, 0,2 g de cada filme foram imersos em 4 mL de TSB contendo aproximadamente 10^6 UFC/mL da bactéria em teste. Em seguida, o sistema foi mantido a 37 °C (*S. enterica*) ou 30 °C (*B. cereus*) durante 24 h com agitação contínua (150 rotações por minuto (r.p.m.)) utilizando uma incubadora com agitação (modelo Innova, New Brunswick Scientific, Estados Unidos). Tubos sem os filmes foram utilizados como controlo. Após a incubação, 100 µL de diluições seriadas foram inoculados por espalhamento em placas de TSA, que foram posteriormente incubadas na respetiva temperatura ótima de crescimento de cada bactéria avaliada por 16-24 h. O número de unidades formadoras de colónias foi contado manualmente e a atividade antimicrobiana expressa como número de reduções do Log (UFC)/mL, calculado de acordo com a equação 12.

$$\text{reduções Log} = \log B - \log A \quad (12)$$

Onde B e A correspondem às contagens de bactérias viáveis no tratamento controlo e nos tratamentos avaliados após 24 h de incubação, respetivamente.

3.6.3. Ensaio de difusão dos antioxidantes

O estudo de migração, ou seja, da libertação dos compostos ativos da matriz polimérica, é fundamental quando se fala em desenvolvimento de embalagens ativas, uma vez que o principal mecanismo de ação destes materiais é por meio da difusão dos compostos incorporados para os alimentos embalados, onde desempenharão seu papel protetor. Desta forma, o ensaio de migração é primordial para avaliação da eficácia do biopolímero desenvolvido.

A quantificação “in vitro” da difusão dos compostos antioxidantes dos nanocompósitos ao longo do tempo foi realizada por meio de teste de difusão (López-de-Dicastillo *et al.*, 2012) utilizando uma solução de 95% de etanol

(alimentos gordurosos) como meio simulador. Este simulador alimentar foi escolhido uma vez que o objetivo principal / inicial da embalagem foi retardar o processo oxidativo em matrizes alimentares, desta forma optou-se pelo simulador dos alimentos mais suscetíveis à tais processos deterioradores.

Periodicamente, a concentração dos compostos fenólicos totais no meio simulador foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu (Singleton, Orthofer, e Lamuela-Raventós, 1999): Resumidamente, 1 mL do meio simulador foi adicionado a 3 mL de água e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 min, adicionou-se 0,75 mL de carbonato de sódio (5% m/v), e a mistura foi incubada 60 min ao abrigo de luz e à temperatura ambiente ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando-se um espectrofotômetro UV/VIS pela leitura da absorvância no comprimento de onda de 760 nm. Uma reta de calibração de ácido gálico (0-200 mg/L) foi utilizada para o cálculo dos resultados, que foram expressos em mg equivalente de ácido gálico (mg EAG/L).

Os coeficientes de difusão também foram calculados por meio da curva de $M_{S,t}/M_{E,0}$ versus $t^{0,5}$ usando os dados iniciais de migração de acordo com o modelo baseado na segunda lei de Fick, (Eq. 13) (Chungy *et al.*, 2002):

$$\frac{M_{S,t}}{M_{E,0}} = \frac{2}{L_e} \left(\frac{Dt}{\pi} \right)^{0,5} \quad (13)$$

Onde $M_{S,t}$ (mg EAG) corresponde ao teor de compostos fenólicos totais migrados para o alimento (neste caso para o simulador), t é o tempo, $M_{E,0}$ (mg EAG) é a quantidade total de compostos fenólicos incorporados na embalagem, L_e (cm) a espessura dos corpos de prova e D (cm^2/s) é o coeficiente de difusão dos compostos migrados.

3.6.4. Atividade antioxidante “in vitro”

A partir das alíquotas coletadas nas condições de ensaio descritas no item 3.6.3, foi determinada a atividade antioxidante “in vitro” dos filmes ativos pelo ensaio de captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina) de acordo com metodologia descrita por López-de-Dicastillo *et. al* (2012) e Santos *et. al* (2012).

Em 3 mL de solução etanólica de DPPH 60 µM foi adicionada uma alíquota de 1 mL do meio simulador. A mistura foi mantida ao abrigo de luz e à temperatura ambiente (20 ° C ± 5 ° C) por 20 minutos. A quantificação foi realizada utilizando-se um espectrofotômetro UV/VIS no comprimento de onda de 517 nm pela leitura da absorvância. A percentagem de inibição foi calculada usando a equação 14. Como controlo utilizou-se 1 mL de etanol 95%.

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(Abs_{controle} - Abs_{amostra})}{Abs_{controle}} \times 100 \quad (14)$$

A atividade antioxidante dos filmes também foi monitorizada pelo ensaio do radical catião ABTS (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolína-6-sulfónico), segundo metodologia descrita por Cipriano (2011). A geração do catião cromóforo ABTS^{•+} foi realizada a partir da reação da solução de ABTS 7 mM e persulfato de potássio 2,45 mM (K₂S₂O₈), na proporção 1:1 (v/v), durante 16 h ao abrigo da luz. Após este período a solução foi diluída em etanol 80% até se obter uma absorvância de 0,70 ± 0,05, lida em espectrofotômetro UV/VIS no comprimento de onda de 734 nm.

Em tubos de ensaios, foram adicionadas alíquotas de 0,5 mL do meio simulador coletadas nas condições de ensaio descritas no item 3.6.3 e 3,5 mL da solução ABTS^{•+}. As misturas foram mantidas por 6 minutos ao abrigo da luz, com posterior leitura da absorvância em espectrofotômetro UV/VIS no comprimento de onda de 734 nm. A atividade antioxidante total foi calculada a partir de curva analítica de Trolox (0 – 0,15 µmol/L) nas mesmas condições das amostras e os resultados expressos em µmol/L equivalente de Trolox por litro de meio simulador (TEAC – capacidade antioxidante equivalente a Trolox).

3.7. Atividade “in situ” dos filmes ativos – aplicação das películas ativas

A carne de frango é considerada um alimento saudável rico em proteína de alto valor biológico, vitaminas, minerais e ácidos gordos essenciais polinsaturados (ómega-3) (FAO, 2013). As características intrínsecas deste produto, i.e. alto teor proteico, humidade e pH favorecem o crescimento de microrganismos patogénicos e/ou deterioradores (Latou, Mexis, Badeka, Kontakos, e Kontominas, 2014; Petrou, Tsiraki, Giatrakou, e Savvaidis, 2012), diminuindo a

sua vida de prateleira. Para além das alterações resultantes do desenvolvimento microbiano, a carne de frango crua é altamente suscetível à oxidação lipídica devido ao seu elevado conteúdo de ácidos gordos insaturados (Warriss, 1999), sendo, por isso, considerada um alimento altamente perecível. Desta forma, este alimento foi escolhido como matriz alimentar para aplicação dos biopolímeros devido a sua alta perecibilidade.

Para montagem da experiência utilizou-se carne fresca de frango (peito) adquirida em comércio local. A carne foi picada e separada em porções de cerca de 30 g que foram embaladas nos bio-nanocompósitos (5 x 18 cm) (Tabela 3.1) e acondicionadas dentro de recipientes plásticos com tampa (Fig. 3.3). Também foram avaliados como controlos carne picada sem qualquer proteção (simulando a condição máxima de deterioração) e carne picada envolvida em películas aderentes comerciais (PVC) ambas também acondicionadas dentro de recipientes plásticos com tampa. O sistema foi armazenado sob refrigeração (5 ± 2 °C) durante 15 dias.

Tabela 3.1. Tratamentos utilizados na experiência de aplicação dos filmes

Tratamento	MMT (%)	Extrato 1 (%)	Extrato 2 (%)
1	0	0	0
2	0	0,5	0,5
3	0	1,0	1,0
4	0	2,0	2,0
5	2,5	0	0
6	2,5	0,5	0,5
7	2,5	1	1
8	2,5	2	2
9*	-	-	-
10**	-	-	-

* 9 – Carne fresca frango sem filme (exposta); 10** - PVC.



Figura 3.3. Montagem dos ensaios “in situ”.

O ensaio foi realizado em três repetições tendo ao fim de 0, 3, 7, 10 e 15 dias de armazenamento as amostras sido analisadas em termos físico-químicos

(pH, acidez total, cor e humidade), grau de oxidação lipídica (determinação dos TBARS) e contaminação microbiológica (contagem total de mesófilos aeróbicos e coliformes totais).

O pH e a acidez total foram determinados de acordo com a metodologia descrita por IAL (2008). Resumidamente, homogeneizou-se 5 g de carne em 50 mL de água a 40 °C, e o pH foi determinado utilizando-se um potenciômetro pela imersão direta do eletrodo. A acidez total titulável foi determinada através de titulação com solução NaOH 0,1 N até coloração rósea, utilizando-se fenolftaleína 0,1 % como indicador, e os resultados expressos como g de ácido oleico por 100 g de carne.

A cor foi determinada por meio de leitura direta dos parâmetros L, a*, e b*. A análise foi conduzida de acordo com a escala de cor CIELab, utilizando o colorímetro Minolta (CR 400/410, Japão) com fonte de luz D 65, e ângulo visual de 10°. O ângulo de hue foi calculado de acordo com as equações 2, 3 ou 4.

A humidade das carnes foi determinada por meio de secagem em estufa a 105 °C por aproximadamente 12 horas (IAL, 2008).

O grau oxidativo foi determinado por meio da quantificação dos produtos secundários da oxidação – TBARS (Rosmini *et al.*, 1996). Amostras de 5 g de carne foram pesadas em erlenmeyers aos quais se adicionou 10 mL de ácido tricloroacético (TCA) 7,5% (m/v). Os erlenmeyers foram submetidos à agitação por 1 hora e em seguida as misturas foram filtradas através de papel de filtro qualitativo. Combinou-se em tubos de ensaio 5 mL do filtrado com 5 mL de ácido 2-tiobarbitúrico 0,02 M. Os tubos foram aquecidos em banho de água (Memmert, Alemanha) a 95 °C durante 30 minutos, tendo, após arrefecimento, as absorvâncias das amostras sido lidas em espectrofotômetro UV/VIS a 530 nm. A quantificação de MDA foi feita a partir de curva analítica construída com concentrações conhecidas de MDA, utilizando-se 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP). A curva foi realizada utilizando-se 5 tubos contendo 5 mL de TCA combinados com quantidades crescentes (10 a 50 µL) de TEP 10⁻³ M. Os resultados foram expressos em mg de MDA/kg de carne.

A contaminação microbiológica foi determinada através da contagem total de mesófilos (ISO 4833-1, 2013) e coliformes totais (ISO 4831, 2006). Resumidamente, em frascos estéreis, a 1 g da carne foi adicionado 9 mL de água de diluição estéril (solução 0,1% m/v de peptona e 0,85% m/v NaCl) tendo a mistura sido homogeneizada por 30 segundos. Em seguida, diluições seriadas foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio agar padrão para contagem (PCA) e tubos contendo caldo verde brilhante, tendo as placas sido incubados a 30 ± 2 °C por 72 h e os tubos a 30 ± 2 °C por 48 h, respetivamente para as análises de contagem microrganismos totais viáveis e coliformes totais.

De modo a se verificar se houve migração da MMT para o alimento, foram determinados minerais (nomeadamente o magnésio e o sódio, por serem componentes químicos destas montmorilonites) nas amostras de carne acondicionadas nos filmes ativos reforçados com a nanoargila, ao fim de 0, 7 e 15 dias de armazenamento. O produto sem contato com os bio-nanocompósitos foi usado como controlo. Os minerais foram quantificados a partir das cinzas previamente obtidas, via digestão com 10 mL de HNO₃ (1:1) a 95 °C por 20 minutos, sendo a análise realizada utilizando espectrofotómetro de absorção atómica (modelo Zeenit 700, Analytikjena, Alemanha) (Maurizio Avella *et al.*, 2005).

3.8. Análise estatística dos resultados

Para a primeira etapa das experiências, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com uma entrada, e em caso de significância, as médias foram comparadas utilizando-se o teste Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Já na etapa seguinte, após a escolha dos melhores extratos e argila, os resultados foram submetidos à ANOVA com duas entradas (concentração do extrato x concentração argila), e em caso de interação sem significância estatística ($p > 0,05$), procedeu-se a ANOVA com uma entrada e o teste de médias utilizando-se o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Toda a análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa Statistical Analysis System (SAS), versão 9.2.

4

Resultados e Discussão

Seleção dos compostos ativos e da montmorilonite

A primeira fase do projeto teve como objetivo a seleção de compostos ativos, para incorporação no quitosano, de forma a conferir ao biopolímero atividade, e a seleção da montmorilonite, para reforço do biopolímero em termos mecânicos.

4.1. Seleção de compostos ativos de origem natural – Avaliação dos filmes ativos

Para selecionar os compostos de origem natural capazes de conferir melhor atividade aos biopolímeros de quitosano, foram incorporados nos filmes diferentes óleos essenciais (OEA, OEG, OET, OEM e OES) e diferentes extratos hidroalcoólicos (EHA_A, EHA_G, EHA_CV, EHA_CP, EHA_S). A escolha dos óleos e extratos utilizados e estudados prendeu-se com o facto de serem matrizes ricas em compostos (fenóis, terpenos, entre outros), que podem conferir atividade aos biopolímeros. Os filmes de quitosano incorporados com os diferentes compostos ativos foram caracterizados com o objetivo de avaliar e selecionar as opções que permitiram a obtenção de filmes com melhores propriedades.

Os filmes de quitosano incorporados com 1% (v/v SF) dos cinco óleos essenciais ou dos seis EHAs foram produzidos de forma satisfatória, tendo-se

obtido películas flexíveis, homogêneas, transparentes e de coloração predominantemente amarela (Fig. 4.1).

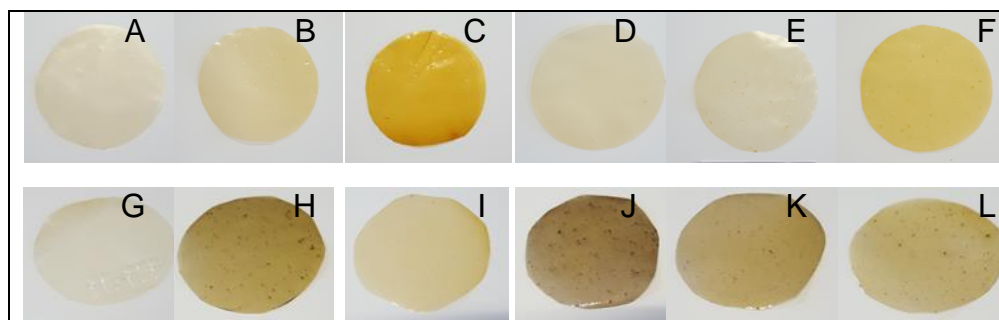


Figura 4.1. Filmes de quitosano (A) controle e incorporados com 1%: (B) OEA, (C) OEG, (D) OET, (E) OEM, (F) OES, (G) EHA_K, (H) EHA_A, (I) EHA_G, (J) EHA_CV, (K) EHA_CP, (L) EHA_S

Para escolha das duas melhores opções, os filmes foram caracterizados quanto a algumas propriedades físicas (cor, opacidade, transparência, humidade, solubilidade em água, e índice de intumescimento, propriedades mecânicas e FT-IR) e ainda quanto à sua atividade antioxidante “in vitro” (ensaio de migração).

4.1.1. Caracterização física dos filmes

4.1.1.1. Espessura dos filmes

A incorporação dos compostos bioativos nos filmes de quitosano não resultou em diferenças significativas na espessura das películas produzidas em comparação com o tratamento controle ($p > 0,05$) (Tabela 4.1). O menor valor de espessura registado foi para o filme incorporado com óleo essencial de tomilho ($52 \pm 3 \mu\text{m}$), e o maior valor na amostra contendo óleo essencial de gengibre ($71 \pm 0 \mu\text{m}$). A espessura média do filme controle foi de $67 \pm 15 \mu\text{m}$ (Tabela 4.1).

Entre os filmes incorporados com os compostos bioativos, apenas dois dos cinco OEs testados (OET e OEG) resultaram em bioplásticos com espessuras diferentes entre si ($p < 0,05$), apesar de tal diferença não ter significância em comparação com o filme controle ($p > 0,05$) (Tabela 4.1).

Os filmes ativos têm uma tendência para apresentar um aumento nos valores de espessura com a adição dos compostos bioativos, tal como reportado em diferentes trabalhos publicados na literatura (Pastor *et al.*, 2013; Peng e Li,

2014; Perdones *et al.*, 2014). Segundo Perdones *et. al* (2014), este comportamento deve-se ao maior conteúdo de sólidos por unidade de superfície, visto que a quantidade do polímero é mantida constante em todos os filmes preparados (no caso do estudo citado, quitosano incorporado com óleo essencial de canela e/ou ácido oleico). O provável aprisionamento de micro gotas de OE entre a matriz polimérica pode também explicar o incremento deste parâmetro, como observado em filmes de quitosano incorporados com óleo essencial de *Satureja hortensis* (Alizadeh, Barzegar, Nasehi, e Samavati, 2018).

No presente estudo, a manutenção dos valores de espessura mesmo com a incorporação dos compostos ativos pode ser explicada devido à quantidade dos extratos incorporados ter sido reduzida, apenas 1% v/v de SF, o que não foi suficiente para aumentar significativamente a espessura dos filmes. Estes resultados indicam também que foi alcançada uma boa dispersão dos OEs e EHAs no polímero de quitosano, e que não se formaram micro gotas nem dos OEs nem dos EHAs dentro da estrutura polimérica.

4.1.1.2. Cor dos filmes

Visualmente, todos os filmes apresentaram uma coloração amarela predominante, com valores positivos para a coordenada b^* (Tabela 4.1). Os extratos hidroalcoólicos interferiram com maior intensidade neste parâmetro que os OEs, e exceto para as amostras incorporadas com EHA_G todos os demais biopolímeros produzidos com incorporação de EHA resultaram no incremento no valor de b^* quando comparados com o controle ($p < 0,05$), ou seja, coloração mais amarela.

Resultados semelhantes foram reportados em filmes de quitosano incorporados com extrato de chá verde, tendo os autores concluído que o extrato contribuiu para adição de cor aos biopolímeros produzidos (Siripatrawan e Harte, 2010). Estas mudanças na coloração original dos filmes podem ser atribuídas à capacidade dos compostos presentes nos EHA de se ligarem estruturalmente ao quitosano (Moradi *et al.*, 2012), ou devido à própria cor característica dos EHA (que apresentaram elevados valores de b^* e reduzidos valores de ângulo de hue, valores não apresentados).

Tabela 4.1. Espessura e propriedades óticas dos filmes de quitosano

Filmes**	Espessura (µm)	L*	a*	b*	Cromaticidade	hue* (°)	Opacidade (mm ⁻¹)
Controlo	67 ± 15 ^{ab}	91,8 ± 0,1 ^a	-1,7 ± 0,1 ^a	1,6 ± 0,1 ^c	2,3 ± 0,1 ^c	137 ± 1 ^a	1,15 ± 0,07 ^{bcd}
Qui_EHA_A	66 ± 8 ^{ab}	89,2 ± 0,3 ^d	-4,9 ± 0,4 ^e	14 ± 2 ^a	15 ± 2 ^a	110 ± 1 ^{de}	1,44 ± 0,24 ^{ab}
Qui_EHA_G	60 ± 6 ^{ab}	91,3 ± 0,1 ^{ab}	-2,1 ± 0,0 ^{ab}	3,4 ± 0,2 ^c	4,0 ± 0,2 ^c	122 ± 1 ^c	1,41 ± 0,19 ^{ab}
Qui_EHA_S	56 ± 5 ^{ab}	90,3 ± 0,1 ^c	-4,5 ± 0,1 ^e	11 ± 0 ^{ab}	12 ± 0 ^{ab}	112 ± 0 ^d	1,15 ± 0,05 ^{bcd}
Qui_EHA_CP	58 ± 5 ^{ab}	89,2 ± 0,0 ^d	-2,4 ± 0,0 ^{bc}	9,3 ± 0,2 ^b	9,6 ± 0,1 ^b	105 ± 0 ^e	1,04 ± 0,19 ^{bcd}
Qui_EHA_CV	61 ± 4 ^{ab}	88,4 ± 0,4 ^e	-3,0 ± 0,4 ^c	12 ± 2 ^a	13 ± 2 ^a	104 ± 0 ^e	0,90 ± 0,10 ^{cd}
Qui_EHA_K	66 ± 2 ^{ab}	89,4 ± 0,3 ^d	-3,8 ± 0,1 ^d	11 ± 1 ^{ab}	12 ± 1 ^{ab}	109 ± 1 ^{de}	1,55 ± 0,04 ^a
Qui_OEA	60 ± 0 ^{ab}	91,7 ± 0,1 ^{ab}	-1,7 ± 0,0 ^a	2,0 ± 0,3 ^c	2,6 ± 0,2 ^c	131 ± 3 ^{ab}	0,76 ± 0,02 ^d
Qui_OEG	71 ± 0 ^a	91,1 ± 0,1 ^b	-2,0 ± 0,0 ^{ab}	3,6 ± 0,2 ^c	4,1 ± 0,2 ^c	119 ± 1 ^c	1,85 ± 0,05 ^a
Qui_OES	54 ± 2 ^{ab}	91,8 ± 0,1 ^a	-1,7 ± 0,0 ^a	1,8 ± 0,1 ^c	2,5 ± 0,1 ^c	134 ± 1 ^{ab}	1,06 ± 0,27 ^{bcd}
Qui_OEM	56 ± 4 ^{ab}	91,8 ± 0,1 ^a	-1,6 ± 0,1 ^a	1,6 ± 0,3 ^c	2,3 ± 0,3 ^c	137 ± 5 ^{ab}	1,08 ± 0,20 ^{bcd}
Qui_OET	52 ± 3 ^b	91,8 ± 0,1 ^{ab}	-1,7 ± 0,0 ^a	2,0 ± 0,1 ^c	2,6 ± 0,1 ^c	130 ± 2 ^b	0,70 ± 0,03 ^d

(a-e): Médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

**Qui (quitosano); EHA (extrato hidroalcoólico); OE (óleo essencial); A (alecrim); G (gengibre); K (kenaf); S (salva); CV (chá verde); CP (chá preto); M (melaleuca); T (tomilho).

Por outro lado, a incorporação dos cinco OEs testados não resultou em diferenças significativas no valor de b^* em comparação com o controle ($p>0,05$) (Tabela 4.1). Moradi e colaboradores (2012) observaram a mesma tendência em filmes de quitosano incorporados com óleo essencial de *Zataria multiflora* Boiss ou extratos de sementes de uvas, corroborando os resultados aqui apresentados. A menor mudança na cor dos filmes (em termos dos valores da coordenada b^*) é provavelmente explicada pela reduzida quantidade de OE incorporada nos filmes, como anteriormente reportado por Perdones *et. al* (2014).

A luminosidade dos filmes foi determinada por meio da medida da coordenada CIE- L^* , a qual variou entre $88,4 \pm 0,4$ a $91,8 \pm 0,1$ (Tabela 4.1).

Desta forma, todos os filmes podem ser considerados claros, uma vez que apresentaram valores de L^* próximos de 100 (branco). Estes resultados estão em concordância com o reportado na literatura para filmes de quitosano-amido incorporados com óleo essencial de tomilho (Mehdizadeh, Tajik, Mehdi, Rohani, e Oromiehie, 2012). Em comparação com o tratamento controle, os filmes incorporados com os OEs não apresentaram diferenças nos valores de L^* ($p>0,05$), exceto para o OEG ($p<0,05$), que apresentou um valor de L^* inferior. Entretanto, com a incorporação dos EHAs o oposto aconteceu, ou seja, apenas os valores de L^* para os filmes com adição de extrato de gengibre não diferiram estatisticamente do controle ($p>0,05$). Todos os demais extratos hidroalcoólicos escureceram os biopolímeros ($p<0,05$). Os menores valores encontrados para a coordenada L^* foram nos filmes incorporados com EHA de chá verde ($88,4 \pm 0,4$). Os EHAs de alecrim, chá preto, kenaf e salva, apresentaram uma luminosidade superior que se aproximou da maior luminosidade apresentada pelos filmes adicionados de EHA de gengibre ($91,3 \pm 0,1$), embora a diferença apresentada seja significativa ($p<0,05$).

A cromaticidade e o hue^* apresentaram comportamentos semelhantes com a incorporação dos diferentes extratos bioativos (Tabela 4.1). Mais uma vez, em termos destes dois parâmetros, a adição dos EHAs resultou em maiores modificações na cor dos filmes do que a incorporação dos OEs. Houve uma maior saturação (maiores valores de cromaticidade) da cor dos filmes devido à

incorporação dos EHAs ($p < 0,05$), que também reduziu o hue* dos biopolímeros, ou seja, tornou os bioplásticos mais amarelos em relação ao controlo ($p < 0,05$). Não se verificaram diferenças significativas na cromaticidade dos filmes incorporados com os vários OEs testados quando comparados com o controlo ($p > 0,05$) e para o parâmetro hue*, apenas os OEG e OET diminuíram o ângulo de hue ($p < 0,05$), tendo desta forma tornado os filmes um pouco mais amarelos.

As alterações nos valores de luminosidade, cromaticidade e hue* observadas nos filmes incorporados com EHAs podem ser explicadas pela cor característica dos próprios EHAs, como discutido anteriormente em relação aos valores de b*. Filmes de quitosano incorporados com extratos de chá ricos em polifenóis também apresentaram maior cromaticidade (Wang, Dong, Men, Tong, e Zhou, 2013), de acordo com os resultados observados neste trabalho. Segundo Pastor *et al* (2013) as mudanças ópticas observadas podem ser atribuídas à formação de cristais dos compostos incorporados, que interferem na reflexão da luz. No caso dos OEs, as quantidades incorporadas não foram suficientes para provocar tais alterações na estrutura do polímero, tendo provavelmente apenas modificado levemente a estrutura semicristalina do material sem alterar a reflexão da luz e, conseqüentemente, o ângulo hue e a cromaticidade (Pastor *et al.*, 2013).

4.1.1.3. Transparência e opacidade

A transparência é uma propriedade crucial para filmes destinados ao acondicionamento de alimentos, visto que tais películas podem ser utilizadas na cobertura da superfície do alimento e devem, desta forma, garantir a boa apresentação / aparência do produto embalado (Jridi *et al.*, 2014), podendo interferir diretamente na aceitação ou rejeição do alimento pelos consumidores (Peng e Li, 2014). Desta forma, a manutenção da transparência é desejável, e pretende-se que a incorporação dos compostos ativos não resulte em alterações significativas desta propriedade.

Os espectros de varrimento dos filmes incorporados com EHAs ou OEs estão apresentados na Figura 4.2A e Fig. 4.2B, respetivamente. Nas imagens verifica-se que os filmes controlo já apresentam boas propriedades de barreira à

luz UV. Com efeito, nos comprimentos de onda de 200 nm e 300 nm, o filme foi permeável à luz apenas em 0,54% e 56%, respectivamente.

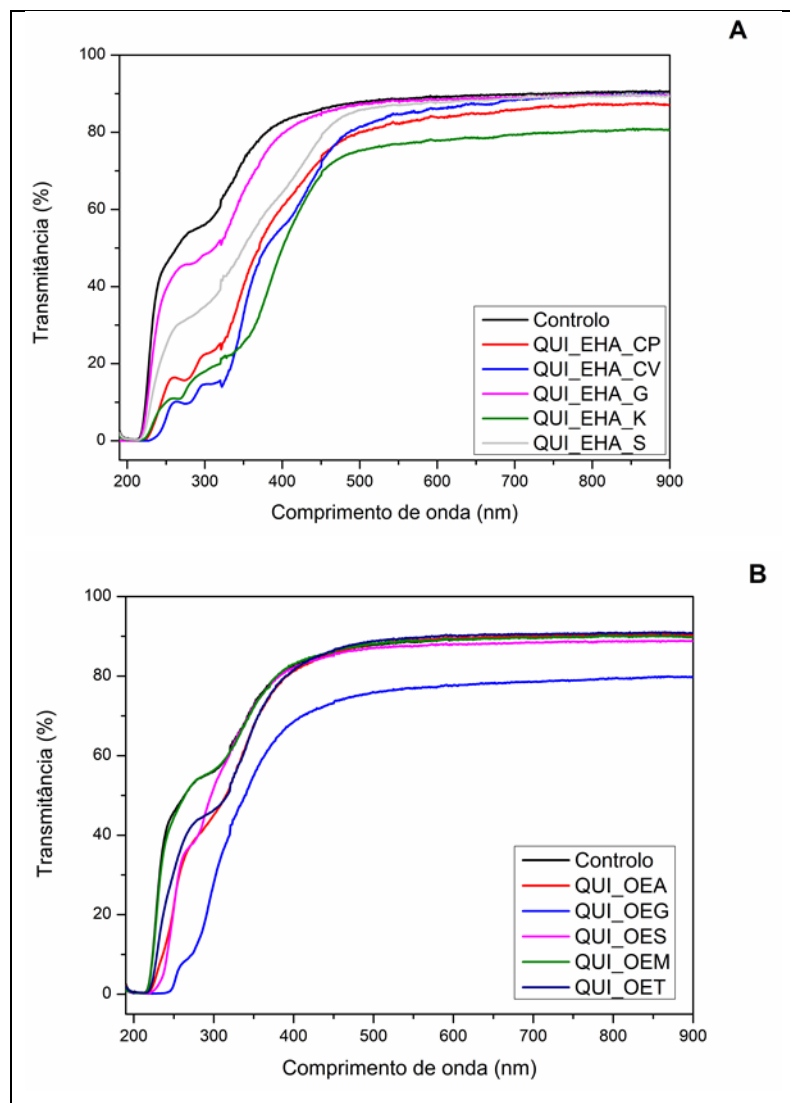


Figura 4.2. Espectros de varrimento de filmes puros de quitosano e filmes incorporados com EHAs (A) ou OEs (B)

*Qui (quitosano); EHA (extrato hidroalcoólico); OE (óleo essencial); A (alecrim); G (gengibre); K (kenaf); S (salva); CV (chá verde); CP (chá preto); M (melaleuca); T (tomilho).

A incorporação dos extratos naturais alterou a propriedade de barreira à luz a baixos comprimentos de onda, podendo destacar-se o seguinte: (i) filmes incorporados com EHAs apresentaram uma barreira à luz superior quando comparados com o controlo no comprimento de onda de 200 nm, mas a 300 nm a barreira foi significativamente superior (entre 15-80% de redução na transmitância dos filmes quando comparados com o controlo) (Fig. 4.2A); (ii) a capacidade de barreira à luz dos biopolímeros incorporados com OEs, para ambos os comprimentos de onda (200 ou 300 nm), foi menor do que a dos filmes incorporados

com EHA, com maior evidência a 300 nm onde os filmes com OEs obtiveram reduções de 0-50% na transmitância de luz em comparação com o controle (Fig. 4.2B). A única exceção foi para o filme incorporados com OEG que apresentou maior bloqueio à luz do que o filme incorporado com o extrato hidroalcoólico equivalente (EHA_G).

A luz, especialmente nos comprimentos de onda do UV, desempenha um papel importante no processo de oxidação, uma vez que catalisa as reações químicas que aceleram este processo de deterioração dos alimentos (Márquez-Ruiz *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2013). Desta forma, materiais de embalagem com boa capacidade de bloqueio da luz UV são vantajosos no ramo alimentar, uma vez que conferem uma proteção extra, com possibilidade de promover a extensão da vida útil do produto embalado (Kanatt *et al.*, 2012). Como discutido anteriormente, nos filmes com incorporação de ambos extratos (oleosos ou hidroalcoólicos) foi alcançada uma melhoria na barreira à luz UV, embora com maior significância nos filmes de quitosano incorporados com EHAs (o que foi atribuído à maior saturação de cor dos EHAs). Resultados similares foram reportados por diversos autores que desenvolveram biopolímeros semelhantes (Kanatt *et al.*, 2012; López-Mata *et al.*, 2013; Sánchez-González, González-Martínez, Chiralt, e Cháfer, 2010).

Em comprimentos de onda maiores (luz visível), quanto maior for a porcentagem de transmitância, maior será a transparência dos filmes, e por consequência, menor a sua opacidade (Kanatt *et al.*, 2012). O filme controle apresentou uma opacidade média de $1,15 \text{ mm}^{-1}$ (Tabela 4.1), e em comparação com os filmes incorporados com os compostos ativos, não houve diferença significativa ($p>0,05$) na opacidade, tendo-se observado uma tendência de aumento dos valores de opacidade quando se adicionou EHA, e uma diminuição com a incorporação dos OEs. Os tratamentos com adição de OEG e EHA_K foram os únicos que mostraram resultados significativamente superiores ao controle ($p<0,05$).

Os resultados observados podem ser explicados considerando que o filme de quitosano é denso, fechado e opaco. As gotículas de OE inseridas entre as cadeias do polímero interrompem a continuidade da matriz, resultando numa

estrutura mais aberta. A interação entre óleos e moléculas de água modifica o índice de refração do quitosano, afetando desta forma a transparência do filme (Sánchez-González *et al.*, 2010). Em relação à incorporação dos EHAs, Siripatrawan e Harte (2010) e Wang *et. al* (2013) também observaram um incremento na opacidade devido à incorporação de extratos de plantas em filmes de quitosano, corroborando os resultados apresentados na Tabela 4.1. No estudo agora apresentado, a tendência para o incremento na opacidade dos filmes incorporados com HAE pode ser atribuída à cor dos extratos utilizados, como explicado anteriormente (item 4.1.1.2).

4.1.1.4. Solubilidade em água, humidade e índice de intumescimento

Na Tabela 4.2 apresentam-se os resultados obtidos da solubilidade em água, humidade e índice de intumescimento dos filmes em estudo. Como uma tendência, verificou-se um incremento no teor de água e solubilidade e uma diminuição no grau de intumescimento quando os filmes de quitosano foram incorporados com OEs e EHAs. A incorporação dos extratos hidroalcoólicos resultou em alterações mais significativas ($p < 0,05$) na solubilidade, humidade e índice de intumescimento do que a incorporação dos óleos essenciais (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Solubilidade em água, humidade e índice de intumescimento

Filmes	Humidade (%)	Solubilidade em água (%)	Índice de intumescimento (%)
Controlo	13 ± 1 ^d	17 ± 1 ^{cd}	191 ± 22 ^{ab}
Qui_EHA_A	24 ± 1 ^{ab}	28 ± 1 ^a	170 ± 33 ^{bc}
Qui_EHA_G	26 ± 0 ^a	21 ± 4 ^{bc}	73 ± 8 ^f
Qui_EHA_S	24 ± 0 ^{ab}	23 ± 1 ^{ab}	108 ± 3 ^{def}
Qui_EHA_CP	20 ± 1 ^{bc}	21 ± 1 ^{bc}	176 ± 6 ^{bc}
Qui_EHA_CV	28 ± 2 ^a	16 ± 2 ^{cd}	167 ± 11 ^{bc}
Qui_EHA_K	27 ± 2 ^a	21 ± 2 ^{bc}	137 ± 1 ^{cde}
Qui_OEA	17 ± 1 ^{cd}	20 ± 1 ^{bcd}	194 ± 7 ^{ab}
Qui_OEG	16 ± 0 ^{cd}	15 ± 0 ^d	98 ± 15 ^{ef}
Qui_OES	19 ± 1 ^c	19 ± 0 ^{bcd}	151 ± 6 ^{bcd}
Qui_OEM	19 ± 2 ^c	19 ± 0 ^{bcd}	165 ± 1 ^{bc}
Qui_OET	15 ± 3 ^{cd}	20 ± 1 ^{bcd}	233 ± 18 ^a

(a-f): Médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

**Qui (quitosano); EHA (extrato hidroalcoólico); OE (óleo essencial); A (alecrim); G (gengibre); K (kenaf); S (salva); CV (chá verde); CP (chá preto); M (melaleuca); T (tomilho).

A solubilidade em água não foi afetada pela incorporação dos OEs ($p > 0,05$) enquanto que para o teor em água, apenas os óleos essenciais de salva e melaleuca aumentaram significativamente este parâmetro ($p < 0,05$) quando comparados ao filme controle. Entre os OEs, apenas o óleo essencial de gengibre modificou a capacidade do filme em absorver água, diminuindo estatisticamente ($p < 0,05$) o valor encontrado para o índice de intumescimento por comparação com o controle. Para todos os demais óleos, não houve diferenças significativas neste parâmetro ($p > 0,05$) (Tabela 4.2). Os filmes incorporados com EHA apresentaram um menor grau de intumescimento, o que pode indicar um menor volume livre entre os nós do polímero e uma elevada interação entre o quitosano e os polifenóis presentes nos EHA, o que reduz o número de ligações por pontes de hidrogénio com a água (Peng e Li, 2014). Enquanto os OEs são ricos em óleos voláteis (pequenas moléculas com grupo hidroxilo ligado ao anel aromático, como por exemplo timol, carvacrol, eugenol, entre outros), os extratos hidroalcoólicos contêm voláteis e outros compostos fenólicos (Brewer, 2011). Estes outros compostos fenólicos compreendem os ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido rosmarínico, entre outros), diterpenos fenólicos (carnosol e ácido carnosídico) e flavonóides (catequinas e quercetina, principais componentes de plantas e extratos de chá), sendo que o solvente e procedimento de extração determinam a eficiência e o tipo de compostos químicos extraídos (Rusak, Komes, Likić, Horžić, e Kovač, 2008). Portanto, as interações químicas entre a cadeia de quitosano e os antioxidantes incorporados variam conforme a composição do extrato (Silva-Weiss, Bifani, Ihl, Sobral, e Gómez-Guillén, 2013; Siripatrawan e Harte, 2010). Para filmes incorporados com óleos essenciais, a principal interação pode ser atribuída ao grupo amida do quitosano ligado aos grupos hidroxilo dos polifenóis (Silva-Weiss *et al.*, 2013), enquanto que para os EHAs há uma ligação éster extra entre grupos carbonilo dos ácidos fenólicos e o polímero (Siripatrawan e Harte, 2010). Esta interação extra pode explicar as maiores reduções no índice de intumescimento em filmes incorporados com extratos hidroalcoólicos.

Os presentes resultados estão em concordância com o reportado por Mayachiew e Devahastin, (2010), que observaram uma diminuição do grau de

intumescimento dos filmes de quitosano quando foram incorporados extratos de groselha, sendo este comportamento atribuído não apenas à interação intermolecular entre o quitosano e os extratos, mas também às propriedades hidrofóbicas dos extratos. As interações hidrofóbicas entre polifenóis e a região hidrofóbica da matriz polimérica do quitosano são conhecidas (Wu *et al.*, 2013), e essas associações resultam no bloqueio de alguns grupos ativos para adsorção de água, contribuindo para a redução do grau de intumescimento e da solubilidade em água (Kristo, Koutsoumanis, e Biliaderis, 2008; Park e Zhao, 2006; Wu *et al.*, 2013). No entanto, neste trabalho, a redução da solubilidade não foi observada indicando que a interação entre o quitosano e os extratos não foi hidrofóbica. No caso do filme incorporado com OEG, que apresentou menores valores de índice de intumescimento comparativamente ao controlo ($p>0,05$), este comportamento pode ser explicado devido ao maior carácter lipofílico do OEG (Brewer, 2011). O polímero contendo OEG apresentou, igualmente, uma menor solubilidade (mas sem significado estatístico), em comparação com os filmes contendo os restantes OEs.

A maior solubilidade em água e grau de intumescimento podem favorecer a biodegradabilidade do filme (Singh e Sharma, 2008). De facto, a maior solubilidade em água dos filmes incorporados com os antioxidantes naturais (especialmente em relação aos EHAs) pode representar um constrangimento para os filmes produzidos, visto que o bioplástico tende a solubilizar-se nos alimentos (especialmente nas matrizes alimentares ricas em água) aumentando a dificuldade na separação entre o filme e o alimento a ser embalado. Entretanto, é importante salientar que tanto o quitosano como os extratos utilizados podem ser ingeridos, sendo considerados um revestimento comestível. A incorporação do resveratrol em filmes de quitosano também resultou no incremento dos valores de humidade (Pastor *et al.*, 2013), corroborando os resultados obtidos no presente estudo. A solubilidade média em água dos filmes de quitosano sem incorporação de qualquer extrato (controlo) foi de 17 ± 1 %, semelhante aos 24 ± 1 % reportada por Wang *et al.* (2013). Este grupo também observou um incremento na solubilidade em água dos filmes com a incorporação de polifenóis extraídos de chás na matriz do quitosano.

4.1.1.5. Propriedades mecânicas

A avaliação das propriedades mecânicas é fundamental durante o processo de desenvolvimento de novos materiais plásticos, uma vez que a resistência mecânica e extensibilidade adequadas são geralmente necessárias para que as embalagens sejam capazes de resistir às tensões externas e manter a integridade durante a sua utilização (Jridi *et al.*, 2014). A resistência máxima à tração (Tensão máxima, TM), a percentagem de alongamento na rotura (elongação (E)) e o módulo de elasticidade (ME) são três parâmetros importantes na avaliação da força e flexibilidade de filmes plásticos (Aranaz, Mengíbar, e Harris, 2009).

Os parâmetros referidos foram determinados a partir da análise da curva de tensão *versus* deformação dos corpos de prova dos filmes, sendo a TM o valor de tensão máximo antes da rotura, o ME a inclinação na porção elástica da curva (parte linear), ambas expressas em MPa, e a %E a deformação relativa no momento da rotura (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Propriedades mecânicas dos filmes

Filmes	Tensão máxima (MPa)	Elongação (%)	Módulo de elasticidade (MPa)
Controlo	20 ± 5 ^{bcd}	35 ± 7 ^a	342 ± 11 ^{bcd}
Qui_EHA_A	12 ± 2 ^d	44 ± 3 ^a	134 ± 56 ^{ef}
Qui_EHA_G	18 ± 2 ^{cd}	43 ± 5 ^a	117 ± 50 ^f
Qui_EHA_S	21 ± 1 ^{bcd}	39 ± 3 ^a	282 ± 55 ^{cdef}
Qui_EHA_CP	28 ± 3 ^{ab}	41 ± 4 ^a	377 ± 82 ^{bcd}
Qui_EHA_CV	24 ± 5 ^{abc}	35 ± 14 ^a	434 ± 88 ^{bc}
Qui_EHA_K	22 ± 3 ^{bc}	40 ± 10 ^a	204 ± 41 ^{def}
Qui_OEA	28 ± 4 ^{ab}	36 ± 5 ^a	655 ± 6 ^a
Qui_OEG	18 ± 3 ^{cd}	35 ± 10 ^a	186 ± 45 ^{def}
Qui_OES	31 ± 3 ^a	35 ± 5 ^a	700 ± 31 ^a
Qui_OEM	24 ± 2 ^{abc}	38 ± 7 ^a	379 ± 88 ^{bcd}
Qui_OET	31 ± 3 ^a	38 ± 2 ^a	547 ± 157 ^{ab}

(a-f): Médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

**Qui (quitosano); EHA (extrato hidroalcoólico); OE (óleo essencial); A (alecrim); G (gengibre); K (kenaf); S (salva); CV (chá verde); CP (chá preto); M (melaleuca); T (tomilho).

Em geral, a tensão máxima dos filmes incorporados com os óleos essenciais foi um pouco superior do que a do tratamento controlo, apesar de apenas os filmes com OE de salva e tomilho terem apresentado diferença significativa

($p < 0,05$). Estes resultados podem ser explicados devido às interações dos grupos hidroxilo presentes nos compostos voláteis de baixo peso molecular dos OEs (como timol e carvacrol) e os grupos amida da molécula de quitosano que resultou em mudanças significativas nas propriedades mecânicas dos filmes (Brewer, 2011; Siripatrawan e Harte, 2010). A incorporação de compostos naturais de plantas confere não apenas ação ativa (seja como agentes antioxidantes e / ou antimicrobianos), mas também funciona como “cross-linking” (ligação cruzada) e / ou agentes anti escurecimento (Silva-Weiss *et al.*, 2013). Na preparação de filmes, a formação de ligações cruzadas entre as moléculas do polímero e os compostos ativos adicionados, contribui para uma maior estabilidade e resistência mecânica (Mathew e Abraham, 2008; Silva-Weiss *et al.*, 2013).

Em relação aos filmes incorporados com EHAs, não foram observadas diferenças significativas entre as TM dos mesmos e o controle ($p > 0,05$). Provavelmente a quantidade de extrato incorporado não foi suficiente para modificar a resistência mecânica do material. Siripatrawan e Harte (2010), desenvolveram filmes de quitosano incorporados com extratos de chá verde em proporções variando entre 2-20%, e observaram alterações na tensão máxima apenas nos biopolímeros com incorporação de extrato em percentagens superiores a 5%, corroborando os resultados apresentados no presente trabalho (em que apenas 1% de extrato foi incorporado).

Em relação ao alongamento na rotura, a incorporação dos compostos ativos nos filmes de quitosano não resultou em alteração neste parâmetro ($p > 0,05$), por outro lado alterou a rigidez dos mesmos (resultou em diferenças no módulo de elasticidade) ($p < 0,05$) (Tabela 4.3). Os biopolímeros incorporados com extratos hidroalcoólicos de alecrim, kenaf, salva e gengibre apresentaram menores módulos de elasticidade do que o controle (no caso do EHA_G estatisticamente significativo, $p < 0,05$), e em relação aos óleos essenciais, apenas o OEG diminuiu a rigidez dos filmes (sem significância estatística $p < 0,05$). Todos os demais OEs aumentaram o módulo de elasticidade, e para os OES e OEA com significância estatística ($p < 0,05$). A presença de moléculas mais complexas e pesadas no extrato hidroalcoólico de gengibre provavelmente resultou no rompimento das ligações químicas entre as moléculas de quitosano, atuando como um plastificante,

e consequentemente reduzindo a sua rigidez (El-Ghorab, Nauman, Anjum, Hussain, e Nadeem, 2010). Por oposição, as moléculas voláteis de menor peso molecular, presentes nos OEs de salva e alecrim, preencheram os espaços internos da matriz polimérica, favorecendo o desenvolvimento da continuidade estrutural, produzindo filmes com maiores cadeias cruzadas e, consequentemente, mais rígidos (Siripatrawan e Harte, 2010).

Em comparação com valores reportados na literatura, os resultados aqui apresentados são menores do que alguns autores encontraram (Perdones *et al.*, 2014; Sánchez-González *et al.*, 2010) ou maiores (Siripatrawan e Vitchayakitti, 2016). A comparação entre diferentes trabalhos é muitas vezes difícil de se realizar visto que uma vasta gama de fatores pode interferir no resultado final, como o uso de diferentes meios ácidos para solubilização do quitosano, a origem e as características do polímero, assim como o seu grau de desacetilação e porcentagem utilizada para formação da SF, entre outros fatores relacionados com as condições experimentais e de realização dos ensaios (Sánchez-González *et al.*, 2010).

Em resumo, os EHA de chá preto e chá verde, assim como os OEs de salva, tomilho e alecrim podem ser destacados como aqueles que causaram maiores alterações nas propriedades mecânicas dos filmes de quitosano produzidos (do ponto de vista do reforço mecânico). No entanto, curiosamente, nenhuma correlação foi encontrada entre as propriedades mecânicas e as propriedades de solubilidade em água / índice de intumescimento dos filmes. A menor capacidade de absorver água dos filmes incorporados com OEG e os EHAs de gengibre, salva e Kenaf, pode ser atribuída à afinidade entre o polímero e os compostos ativos que preenchem as lacunas internas, reduzindo a adsorção de água. No entanto, tais interações provavelmente não foram suficientes para melhorar a resistência à tração dos bioplásticos, ou seja, um indício que os compostos ativos ligados ao polímero não induziram uma mudança estrutural (Rubilar *et al.*, 2013)

4.1.2. Caracterização da atividade dos filmes

De modo a verificar o poder antioxidante dos filmes desenvolvidos, foram realizadas inicialmente as caracterizações dos extratos e óleos em termos de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, assim como o ensaio de migração para os filmes incorporados com os antioxidantes naturais avaliados.

4.1.2.1. Caracterização dos OEs e EHAs

Os teores totais de compostos fenólicos (CFT) assim como a atividade antioxidante dos seis extratos hidroalcoólicos e cinco óleos essenciais testados na produção dos biofilmes encontram-se na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Caracterização dos extratos hidroalcoólicos e óleos essenciais

Extrato hidroalcoólico	CFT** (mg EAG/g planta)	DPPH (μmol equivalente de Trolox/g planta)	ABTS (μmol equivalente de Trolox/g planta)
Chá verde	$68,0 \pm 1,0^a$	904 ± 36^a	1636 ± 77^a
Chá preto	$30,0 \pm 1,0^b$	592 ± 32^b	920 ± 20^b
Kenaf	$11,8 \pm 0,2^d$	160 ± 3^e	147 ± 2^e
Gengibre	$7,4 \pm 0,02^d$	44 ± 1^f	199 ± 0^e
Alecrim	$33,0 \pm 0,0^b$	476 ± 14^c	508 ± 30^c
Salva	$20,8 \pm 0,4^c$	306 ± 8^d	347 ± 8^d
Óleo essencial	CFT** (mg EAG/mL OE)	DPPH (μmol equivalente de Trolox/mL OE)	ABTS (μmol equivalente de Trolox/mL OE)
Gengibre	$16,0 \pm 1,0^b$	$2,83 \pm 0,06^a$	$10,0 \pm 0,3^a$
Alecrim	$8,9 \pm 0,8^c$	$2,98 \pm 0,09^a$	$14,8 \pm 0,1^a$
Salva	$7,0 \pm 0,8^{cd}$	$0,98 \pm 0,02^b$	$11,9 \pm 0,2^a$
Melaleuca	$23,0 \pm 1,0^a$	$0,30 \pm 0,08^d$	$3,9 \pm 0,2^b$
Tomilho	$6,4 \pm 0,3^d$	$0,72 \pm 0,02^c$	$4,4 \pm 0,1^b$

(a-f): Entre óleos essenciais ou extratos hidroalcoólicos, médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

** CFT (compostos fenólicos totais); EAG (equivalente de ácido gálico); OE (óleo essencial).

O poder antioxidante dos extratos hidroalcoólicos apresentou boa correlação com o teor total de compostos fenólicos. Os maiores conteúdos de CFT foram encontrados nos EHAs de chá verde, chá preto e alecrim, assim como tais extratos apresentaram o maior poder antioxidante, em ambos ensaios utilizados (DPPH e ABTS). Os extratos de kenaf e gengibre foram os que apresentaram menor conteúdo em CFT tendo igualmente sido aqueles que apresentaram atividade antioxidante mais reduzida (Tabela 4.4). A comparação dos resultados

encontrados com os dados presentes na literatura não é uma tarefa simples, uma vez que a composição em fenóis dos extratos pode variar com a origem das plantas e com o método de extração utilizado (Rusak *et al.*, 2008). Os extratos hidroalcoólicos de kenaf, gengibre e chás verde e preto apresentaram valores para CFT menores que os reportados por vários autores na literatura (Almajano, Carbó, Jiménez, e Gordon, 2008; Brewer, 2011; Chan, Lim, Chong, Tan, e Wong, 2010; Liu, Qiu, Ding, e Yao, 2008; Pascoal *et al.*, 2015; Turkmen *et al.*, 2006). Por outro lado, os extratos de alecrim e salva apresentaram teores de fenólicos totais superiores aos obtidos em outros trabalhos utilizando métodos semelhantes de extração (Vallverdú-Queralt *et al.*, 2014). Basicamente, as diferenças podem ser atribuídas aos diferentes tempos de contato entre os solventes e as plantas, às diferentes temperaturas utilizadas, ao fornecimento ou não de energia ao sistema (por exemplo uso de ultrassom), ou ao tipo de solvente utilizado, uma vez que a polaridade do mesmo afeta diretamente o processo de extração dos compostos fenólicos (Almajano *et al.*, 2008; Brewer, 2011; Turkmen *et al.*, 2006).

Em relação aos óleos essenciais, apenas para os óleos de gengibre e tomilho se observou uma correlação entre os teores de fenólicos totais e atividade antioxidante (Tabela 4.4). O elevado teor de CFT presentes no óleo essencial de melaleuca não correspondeu a uma elevada atividade antioxidante. Por outro lado, o OEA mesmo apresentando baixo conteúdo em compostos fenólicos totais em comparação com os OEs de gengibre e melaleuca, foi o óleo que demonstrou um maior poder antioxidante. Os óleos essenciais de salva e tomilho apresentaram valores similares de CFT, e na mesma medida atividade antioxidante semelhante pelo método de estabilização do radical DPPH. No entanto, o poder antioxidante do OES medido pelo ensaio ABTS foi significativamente superior ao do OET. Este comportamento é facilmente explicado pelas diferentes composições químicas dos óleos. Com efeito o poder antioxidante dos OEs depende não só da sua concentração em compostos fenólicos, mas também do seu perfil fenólico específico (Brewer, 2011), para além de nos OEs ainda encontrar-se outros tipos de compostos de conhecida atividade antioxidante, nomeadamente terpenos. Mais uma vez, os resultados obtidos neste estudo para a CFT e atividade

antioxidante dos OEs apresentam diferenças em relação aos reportados na literatura, o que pode ser explicado por diversos fatores relacionados com as plantas utilizadas para extração dos óleos, como a localização geográfica da colheita, a altura do ano da colheita, as condições climáticas, o estado nutricional das plantas, assim como os métodos de extração utilizados (Badawy e Abdelgaleil, 2014).

4.1.2.2. Ensaio de migração

Apenas os filmes incorporados com os óleos essenciais apresentaram difusão dos compostos fenólicos para o meio simulador durante o tempo ensaiado (10 dias / 37 °C \pm 2 °C). Os compostos antioxidantes presentes nos extratos hidroalcoólicos não migraram para o simulador alimentar, não tendo sido, desta forma, detetados pelos métodos de Folin-Ciocalteu ou ensaios DPPH e ABTS. Aparentemente, os compostos fenólicos presentes nos EHAs apresentaram maior afinidade com a matriz polimérica do que com o simulador utilizado, resultando numa pequena solubilidade e migração indetetável pelos métodos utilizados. Quando há um bom aprisionamento dos compostos incorporados na matriz polimérica a difusão é reduzida (Jamshidian, Tehrany, e Desobry, 2012). Os filmes incorporados com os EHA apresentaram maior solubilidade em água e menores índices de intumescimento do que os filmes com OEs (ver cap. 4.1.1.4), indicando a existência de menores espaços entre as cadeias poliméricas para absorção do etanol (simulador), e por consequência menor relaxamento da matriz polimérica e libertação / difusão dos compostos fenólicos. Outro fator que provavelmente pode explicar os resultados obtidos é a reduzida quantidade (1% v/v) incorporada dos EHA. Novas formulações contendo teores de EHA mais elevados provavelmente resultariam em migração dos compostos fenólicos, como foi observado no copolímero de etileno vinil álcool incorporado com 5% de extrato de chá verde (López-de-Dicastillo *et al.*, 2012).

A elevada interação entre os EHA e o polímero de quitosano é uma vantagem uma vez que os polifenóis dos extratos incorporados podem também proteger o filme produzido dos fenómenos de oxidação (Tian *et al.*, 2013). Como se pretende que os filmes desenvolvidos sejam utilizados como embalagem ativa

para alimentos, quando em contato direto com o produto embalado (uma matriz mais complexa com frações hidrofílicas e hidrofóbicas), espera-se um comportamento diferente, com potencial difusão dos compostos ativos para o alimento, resultando numa conservação gradual ao longo da sua vida útil. Além disso, os polifenóis aprisionados nas cadeias de quitosano podem melhorar as propriedades de barreira dos filmes, retardando o possível contato do alimento embalado com água, oxigénio ou luz, já que os compostos bioativos representam um escudo e um meio de reação prévio ao alimento.

Para os filmes incorporados com OEs foi observada a migração dos compostos fenólicos para o meio simulador, de forma gradual até um máximo (primeiras 48 horas) (Fig. 4.3A e 4.3B), em concordância com trabalhos previamente publicados (López-de-Dicastillo *et al.*, 2012; Ramos, Jiménez, *et al.*, 2014). Os teores de compostos fenólicos difundidos foram proporcionais aos teores presentes nos óleos puros, ou seja, a maior migração foi registada no meio simulador contendo filmes incorporados com os óleos com maior teor de compostos fenólicos (OE de gengibre e melaleuca), enquanto que os biopolímeros incorporados com os óleos que apresentaram menores teores em compostos fenólicos (alecrim, tomilho e salva) mostraram menor migração destes compostos. Todos os filmes apresentaram uma razão de libertação dos compostos fenólicos semelhante (entre 34-52% do total incorporado), com exceção do filme incorporado com OEG, cuja difusão foi praticamente a totalidade do incorporado (92%) (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Cinética de difusão dos compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante no simulador

Filmes*	Coeficiente de difusão (cm ² /s)	Máximo difundido / total incorporado	Máxima atividade antioxidante no simulador / máxima atividade possível
Qui_OEM	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^{-10}$	0,40	0,88
Qui_OEA	$(0,6 \pm 0,1) \times 10^{-10}$	0,34	0,61
Qui_OES	$(2,3 \pm 0,3) \times 10^{-10}$	0,52	0,94
Qui_OET	$(1,5 \pm 0,4) \times 10^{-10}$	0,41	0,84
Qui_OEG	$(5 \pm 1) \times 10^{-10}$	0,92	1,0

* Qui (quitosano); OEA (óleo essencial de alecrim); OEG (óleo essencial de gengibre); OEM (óleo essencial de melaleuca); OES (óleo essencial de salva); OET (óleo essencial de tomilho).

O processo de difusão de compostos (aditivos ou contaminantes) do material de embalagem para alimentos ou simuladores alimentares segue um modelo baseado na segunda lei de Fick, extensivamente utilizado para determinar os coeficientes de difusão de tais compostos (Chungy *et al.*, 2002; Fortunati, Peltzer, Armentano, Jiménez, e Kenny, 2013).

Os coeficientes de difusão calculados correlacionam-se com a razão de libertação dos compostos fenólicos, e estão dispostos na Tabela 4.5. Os filmes incorporados com OEG apresentaram o maior coeficiente de difusão seguido pelos tratamentos do quitosano com OES, OET, OEM e por último OEA. Os resultados estão de acordo com o reportado por Ramos *et. al* (2014), que calcularam os coeficientes de difusão de carvacrol e timol incorporados em filmes de polipropileno para diferentes simuladores. Estes autores encontraram valores de difusão na mesma magnitude das nossas determinações: 2×10^{-10} (cm²/s) e 1×10^{-10} (cm²/s) para carvacrol e timol, respetivamente, na sua difusão para etanol 95%.

Segundo Jamshidian *et. al* (2012), vários são os fatores que interferem no processo de migração, nomeadamente: (i) as características do polímero (morfologia, peso molecular, distribuição, cristalinidade, densidade e orientação) que podem interferir no tamanho, forma e distribuição de microcavidades, portanto, no caminho de difusão; (ii) tipo de compostos ativos incorporados (polaridade, forma e solubilidade); (iii) a interação entre o polímero e os compostos ativos incorporados (efeito plastificante). Considerando que a quantidade de glicerol e OE incorporada foi constante em todos os filmes, a diferença no perfil de migração só pode ser explicada pelo tipo de compostos ativos incorporados, ou seja, pela composição química dos vários óleos essenciais, bem como pela solubilidade e polaridade dos compostos ativos neles existentes. No caso do OE de gengibre, a maior difusão dos compostos fenólicos para o simulador provavelmente ocorreu devido à sua maior solubilidade em etanol 95%. Esta elevada difusão dos compostos fenólicos do OEG pode estar também relacionada com o carácter lipofílico dos mesmos, tal como foi indicado na revisão feita por Brewer (2011) sobre antioxidantes naturais.

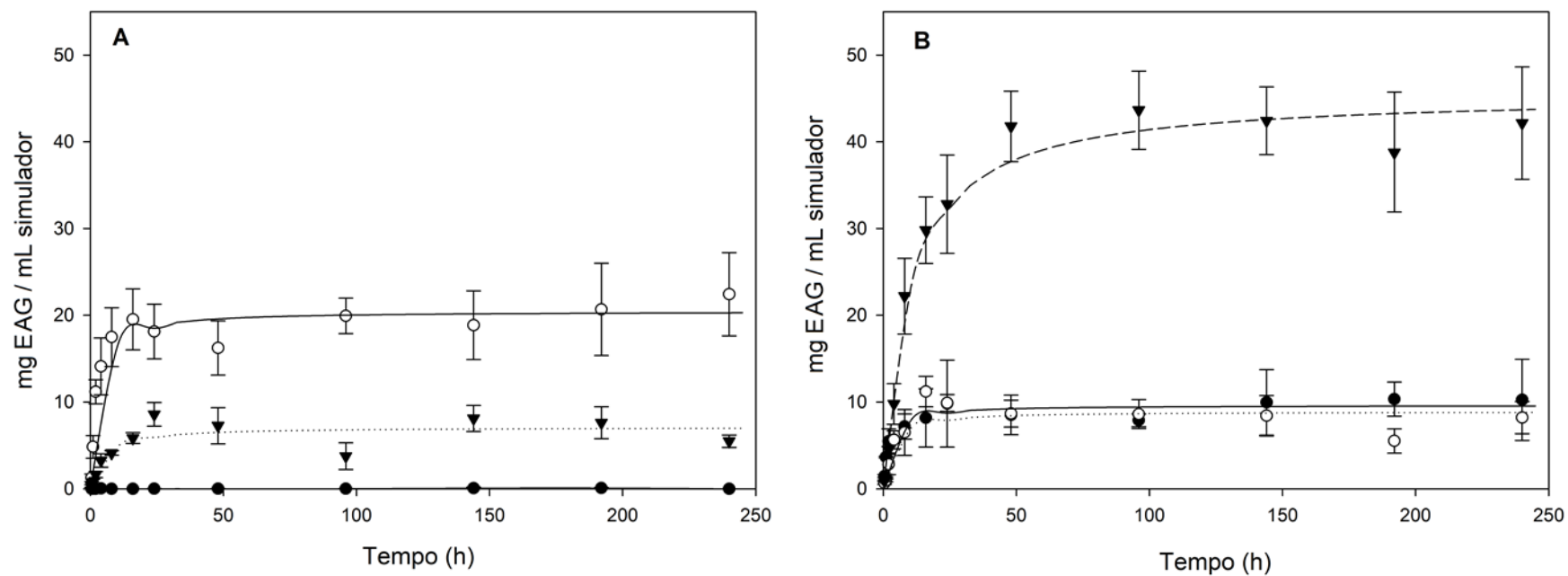


Figura 4.3. Ensaio de migração (compostos fenólicos totais no simulador alimentar). Na figura A: (—●—) Controle; (····○····) Quitosano + OEM; (—▼—) quitosano + OEA. Na figura B: (—●—) quitosano + OES; (····○····) quitosano + OET; (—▼—) quitosano + OEG. OEM (óleo essencial de melaleuca); OEA (óleo essencial de alecrim); OES (óleo essencial de salva); OET (óleo essencial de tomilho); OEG (óleo essencial de gengibre).

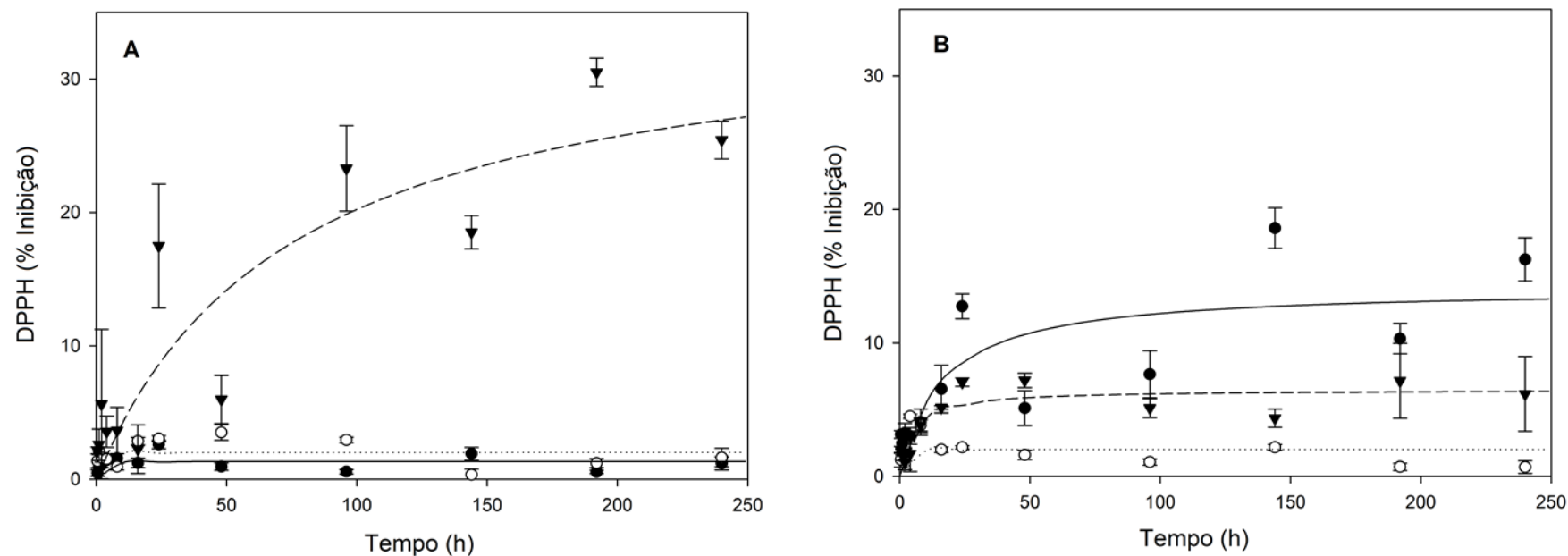
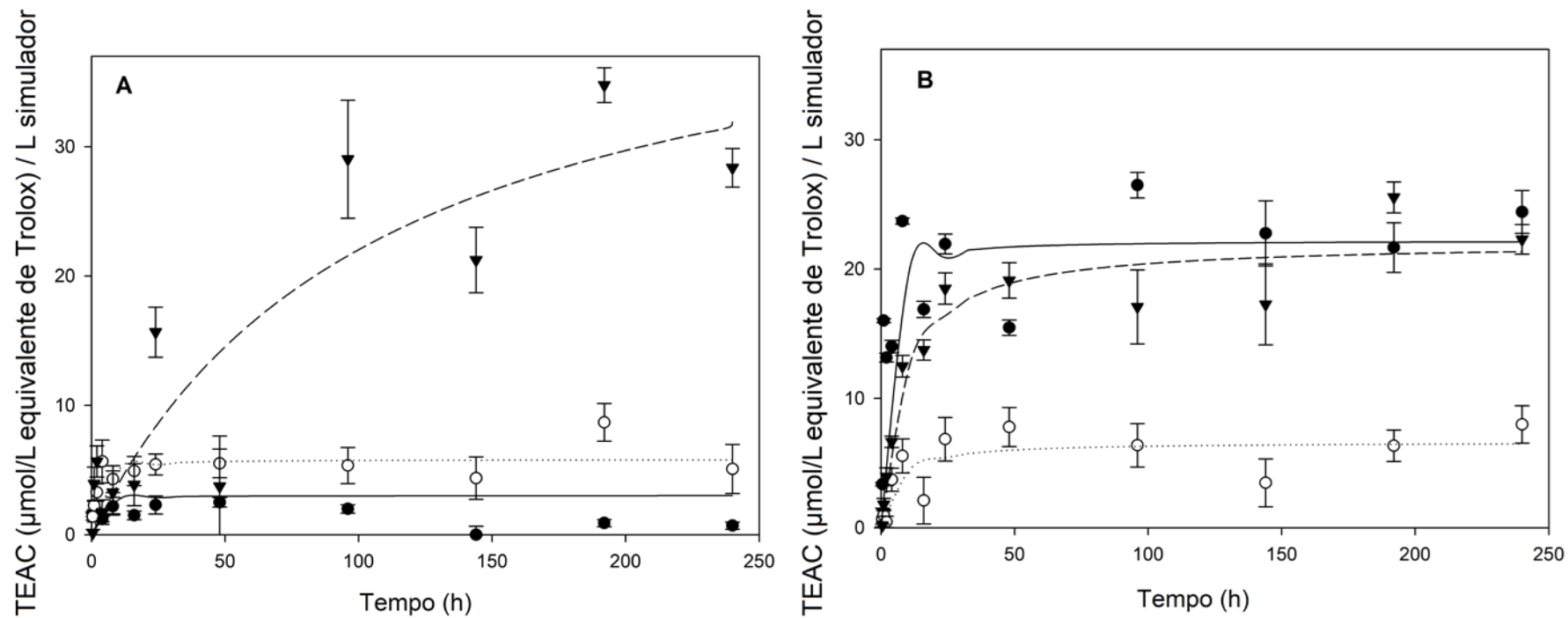


Figura 4.4. Ensaio de migração (atividade antioxidante do simulador pelo método DPPH). Na figura A: (●) Controle; (○) Quitosano + OEM; (▼) quitosano + OEA. Na figura B: (●) quitosano + OES; (○) quitosano + OET; (▼) quitosano + OEG. OEM (óleo essencial de melaleuca); OEA (óleo essencial de alecrim); OES (óleo essencial de salva); OET (óleo essencial de tomilho); OEG (óleo essencial de gengibre).



A atividade antioxidante dos compostos migrados para o simulador, medidos pelos métodos DPPH e ABTS, está representada nas Figuras 4.4 e 4.5, respectivamente. A maior atividade antioxidante, em ambos os ensaios, foi observada nos simuladores após as primeiras 48 horas de ensaio. O perfil de liberação dos compostos antioxidantes foi idêntico em ambos os ensaios (exponencial até um máximo). A única exceção ocorreu para os filmes incorporados com OEA, onde no ensaio do DPPH o equilíbrio ocorreu apenas após 192 horas de contato não tendo sido atingido um patamar de equilíbrio no ensaio ABTS. Neste caso, os compostos com atividade antioxidante apresentaram menor taxa de difusão para o simulador do que o observado nos outros filmes (Tabela 4.5). Segundo Brewer (2011), solventes de média polaridade, como a solução de etanol 50%, são capazes de extrair do alecrim maiores quantidades de compostos com atividade antioxidante que solventes com menor polaridade, como o etanol 95% utilizado no ensaio de migração, o que explica a lenta taxa de difusão dos compostos ativos deste OE para o simulador. No entanto, entre todos os OEs, a maior atividade antioxidante foi registrada para os filmes incorporados com óleo essencial de alecrim, o que está de acordo com os bons resultados também verificados para o óleo puro discutidos anteriormente (Tabela 4.4). Esta elevada atividade antioxidante do OEA pode ser atribuída aos diterpenos fenólicos (ácido carnósico, carnosol, rosmanol, rosmadial, ácido 12-metoxicarnósico, epi-rosmanol e iso-rosmanol) e ácidos fenólicos (rosmarínico e cafeico), que são os constituintes deste OE com maior atividade antioxidante reportada (Brewer, 2011). A atividade antioxidante apresentada nos simuladores contendo os filmes incorporados com os demais OEs testados também apresentou boa correlação com o poder antioxidante dos óleos puros. Desta forma, quanto maior foi a atividade antioxidante dos OEs puros, maior foi a atividade antioxidante observada no meio simulador (tal como observado com o OEA nos ensaios de DPPH e ABTS, e também para os óleos de gengibre e salva no ensaio de ABTS), enquanto que quanto menor foi a atividade antioxidante dos OEs puros menor foi a atividade antioxidante observada no meio simulador (o que se verificou para os óleos de tomilho e melaleuca, Figuras 4.4 e 4.5). A exceção a este comportamento foi observada nos filmes com OEG, em que no ensaio DPPH, o OEG puro apresentou elevada

atividade antioxidante (semelhante à apresentada pelo OEA), mas no meio simulador apresentou uma percentagem de inibição do radical DPPH de apenas 5%, muito inferior aos 25% observados para OEA (Figura 4.4).

A atividade antioxidante do gengibre pode ser atribuída à presença de ácidos fenólicos (cafeico e gálico) e compostos voláteis (por exemplo, α e β - pineno, gingerol, p-cimeno) (Brewer, 2011). Em relação ao OES, a sua atividade antioxidante está ligada com alguns dos mesmos compostos encontrados no alecrim (rosmanol, rosmadial, carnosol, ácido carnósico e ácido rosmarínico) junto com outros flavonóides (Brewer, 2011), e também com α e β -pineno e 1,8-cineol (Burt, 2004). Já o óleo essencial de tomilho, os compostos antioxidantes associados são o timol (o mais efetivo) e outros voláteis, como o carvacrol, α e β - pineno, 1,8-cineol, p-cimeno, ácidos fenólicos como o ácido rosmarínico e flavonóides (Brewer, 2011; Burt, 2004). Os compostos ativos encontrados na melaleuca são o terpen-4-ol, α e γ -terpeno e o 1,8-cineole, mas apenas o último tem atividade antioxidante (Carson, Hammer, e Riley, 2006).

Em termos de atividade antioxidante medida pelo ensaio ABTS, todos os filmes apresentaram resultados semelhantes para o máximo difundido / total incorporado (0,84-1,00), exceto para o filme incorporado com OEA cuja razão foi de apenas 0,61 (Tabela 4.5). No entanto, esta menor difusão de compostos com atividade antioxidante pode ser devida à menor libertação dos fenóis da matriz de quitosano devido à baixa polaridade do simulador, como explicado anteriormente. Também deve ser mencionado que os compostos fenólicos libertados para o meio simulador permaneceram estáveis e não se degradaram durante o teste de migração (10 dias). Não se observou igualmente perda significativa de antioxidantes voláteis durante a secagem dos filmes (< 5%). De facto, o método usado para produzir os filmes foi escolhido para evitar / prevenir estas perdas.

4.1.2.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros de FT-IR dos filmes de quitosano incorporados com os diferentes extratos antioxidantes naturais estão representados na Figura 4.6.

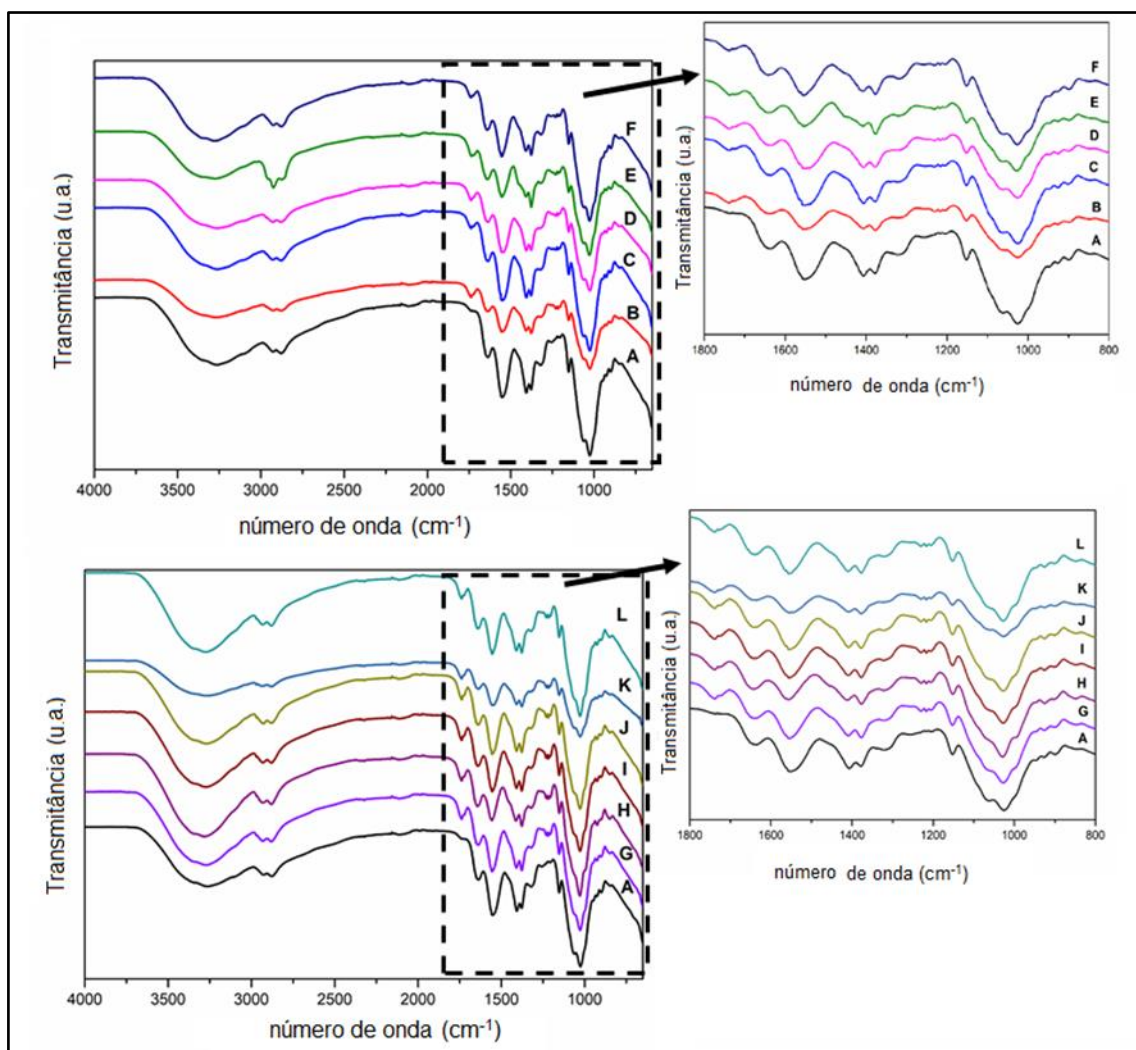


Figura 4.6. FT-IR dos filmes de quitosano. (A) Controle; (B) quitosano + OEM; (C) quitosano + OEA; (D) quitosano + OES; (E) quitosano + OEG; (F) quitosano + OET; (G) quitosano + EHA_S; (H) quitosano + EHA_K; (I) quitosano + EHA_G; (J) quitosano + EHA_CP; (K) quitosano + EHA_CV; (L) quitosano + EHA_A. EHA (extrato hidroalcoólico); OE (óleo essencial); A (alecrim); G (gengibre); K (kenaf); S (salva); CV (chá verde); CP (chá preto); M (melaleuca); T (tomilho).

De uma forma geral não houve grandes diferenças entre os espectros para os diferentes tratamentos, provavelmente devido às pequenas quantidades incorporadas (1% v/v) e ao modo de leitura utilizado (ATR). O espectro do filme controle exibiu as bandas de absorção características do quitosano em 3332 cm^{-1} (estiramento assimétrico de -OH); 3246 cm^{-1} (alongamento assimétrico de -NH); 2867 cm^{-1} (ligação C-H do grupo metilo do -NHCOCH_3); 1635 cm^{-1} (amida I); 1550 cm^{-1} (vibração -NH_2 – da amida II); 1337 cm^{-1} (vibração esquelética envolvendo o estiramento CN da amida III) e $1376\text{-}1404\text{ cm}^{-1}$ (flexão -CH_2) (Ávila, Bierbrauer, Pucci, López-González, e Strumia, 2012; Kim e Thomas, 2007; Silva-

Weiss *et al.*, 2013). Além dos picos característicos da estrutura sacarídea do quitosano em 922 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} e 1047 cm^{-1} (vibrações esqueléticas envolvendo o alongamento C – O) e 1150 cm^{-1} (alongamento assimétrico da ponte C – O – C) (Ávila *et al.*, 2012).

A incorporação dos antioxidantes naturais provocou mudanças nos espectros de absorção entre as bandas 1200 cm^{-1} e 1400 cm^{-1} , devido aos grupos hidroxilo dos compostos fenólicos e às vibrações CO e C = O (Ávila *et al.*, 2012; Silva-Weiss *et al.*, 2013; Siripatrawan e Harte, 2010). A absorção a 1550 cm^{-1} (amida II) diminuiu principalmente com a incorporação do OEG e dos EHAs de chá verde, chá preto e kenaf, sugerindo que houve ligação entre os polifenóis presentes nos extratos e óleos e o grupo amida do quitosano (Silva-Weiss *et al.*, 2013).

O novo pico em $1715\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$, observado em todos os espectros com OEs e EHAs, foi atribuído a uma ligação éster entre os grupos carbonilo dos ácidos fenólicos e quitosano, como sugerido por Silva-Weiss *et al.* (2013) e Siripatrawan e Harte (2010). A redução da absorção observada entre 3500 e 3000 cm^{-1} , para a maioria dos filmes incorporados com óleos e extratos hidroalcoólicos, confirma a ligação entre os compostos fenólicos presentes nos extratos naturais e o quitosano, pois essas bandas correspondem ao estiramento do hidroxilo livre e ao alongamento assimétrico e simétrico das ligações NH no grupo amina. Essa interação entre grupos hidroxilo dos polifenóis e grupos amida do quitosano resulta em melhorias nas propriedades mecânicas e de barreira (Siripatrawan e Harte, 2010; Souza *et al.*, 2017).

4.2. Seleção da melhor montmorilonite

Os resultados da análise de DR-X das três argilas puras, do filme controle e dos filmes incorporados com 2,5% de cada uma delas são apresentados na figura 4.7. As argilas MMTNa e MMTCa exibiram picos de difração característicos de sua estrutura cristalina localizados em torno de $2\Theta = 7,512^\circ$ e $6,333^\circ$, respectivamente. De acordo com a Lei de Bragg estes valores correspondem a um espaçamento interplanar $d_{001} = 11,76$ e $13,95\text{ Å}$ ou $1,18$ e $1,40\text{ nm}$, respectivamente. Estes valores calculados estão em boa concordância com o valor d_{001}

da especificação do fornecedor: 1,17 e 1,55 nm, respectivamente (BYK, 2013b, 2013c). Em relação à MMT20, não foi possível determinar o seu pico de difração característico devido a limitações no equipamento utilizado. No entanto, observa-se no início do difratograma um pico em ângulos 2θ inferiores a 5° (limite do equipamento). De acordo com a especificação da nanoargila, a mesma possui uma distância interplanar de $d_{001} = 3,16$ nm, correspondente a um $2\theta = 2,79^\circ$ (BYK, 2013a) ou seja, referente ao pico não determinado na análise devido às limitações do equipamento. Outro pico é observado no resultado de DR-X da MMT20 em $2\theta = 9,341^\circ$ correspondente ao valor d_{001} de 9,47 Å ou 0,95 nm. Segundo Paiva, Morales e Guimarães (2006) este é um pico de segunda ordem do Cloisite®20A.

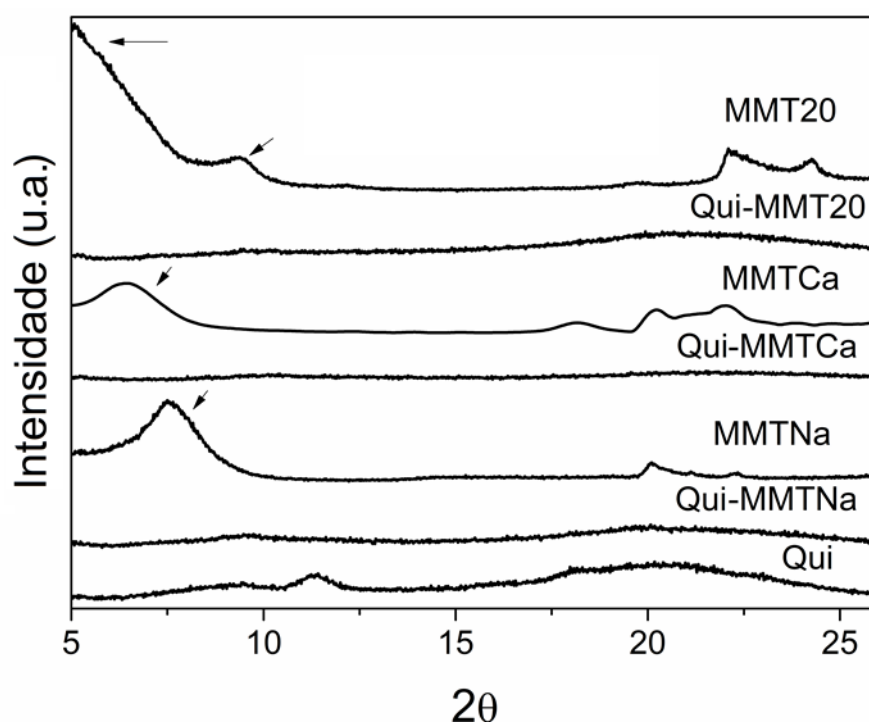


Figura 4.7. Difratogramas das nanoargilas puras, filme de quitosano e dos filmes de quitosano incorporados com as diferentes MMTs. Qui (quitosano), MMT (montmorilonite).

O uso das nanoargilas como reforços poliméricos tem sido extensivamente estudado nas últimas décadas devido à dispersão em tamanho nanométrico da argila nas matrizes poliméricas, melhorando as propriedades mecânicas (aumento do módulo e resistência) e físicas (diminuição da permeabilidade a gases, aumento da resistência ao calor e a solventes) em comparação com o polímero puro ou compósitos convencionais (Rhim e Ng, 2007). No entanto, as melhorias

nas propriedades mecânicas e de barreira pela incorporação das nanoargilas só é alcançada quando se consegue uma dispersão homogênea da montmorilonite na matriz polimérica (Silvestre *et al.*, 2011). Entre os quatro possíveis arranjos morfológicos que a montmorilonite pode assumir (nanocompósitos não intercalados ou tactoides, nanocompósitos intercalados, nanocompósitos esfoliados e nanocompósitos floculados), a estrutura mais desejada é a de nanocompósitos esfoliados seguidos dos intercalados (Rhim e Ng, 2007; Silvestre *et al.*, 2011). Enquanto que no arranjo intercalado, as cadeias poliméricas são inseridas entre as camadas de silicato da argila, organizadas na forma empilhada, nos nanocompósitos esfoliados, ocorre a esfoliação completa ou delaminação das camadas de silicato ao longo da matriz polimérica, o que resulta em melhorias significativas nas propriedades dos polímeros (Dias *et al.*, 2014; Silvestre *et al.*, 2011).

O estudo do grau de intercalação / esfoliação das camadas de silicatos nos nanocompósitos poliméricos geralmente é realizado por meio das técnicas de DRX e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Nos nanocompósitos esfoliados, a extensa separação de camadas resulta no desaparecimento de qualquer pico de difração de DRX (Dias *et al.*, 2014; Pola *et al.*, 2016; Silvestre *et al.*, 2011).

Analisando-se os resultados do DRX dos bio-nanocompósitos produzidos com a incorporação das MMTs testadas (Qui-MMTNa; Qui-MMTCa e Qui-MMT20) (Fig. 4.7), verifica-se que os picos de difração característicos das regiões cristalinas das nanoargilas desapareceram, provavelmente como resultado de uma configuração desordenada da estrutura lamelar, que não foi detetável por DRX, fornecendo fortes evidências de que as camadas de argila assumiram uma configuração esfoliada (Silvestre *et al.*, 2011).

Biopolímeros de quitosano incorporados com diferentes proporções (2,5%, 5% e 10%) de MMTNa foram desenvolvidos e caracterizados por DRX e MET (Wang *et al.*, 2005). Neste trabalho, os autores observaram pelas técnicas utilizadas que houve uma boa miscibilidade entre o polímero e o nanorreforço, devido à natureza hidrofílica e policatiónica do quitosano em meio ácido que

possibilita, por meio da troca catiónica, a fácil incorporação do polímero entre as camadas da argila (Darder *et al.*, 2003), corroborando os nossos resultados.

A incorporação de MMT em biopolímeros é um processo que requer intensa energia para abrir as camadas da argila e evitar a aglomeração do nanomaterial. De forma similar ao realizado neste trabalho, Dias *et al.* (2014) e Pola *et al.* (2016) estudaram a incorporação de montmorilonite em biopolímeros utilizando energia de ultrassons para facilitar a dispersão da MMT na matriz polimérica. Dias *et al.* (2014) incorporou 1% (m/m) de MMTNa em quitosano utilizando banho ultrassónico (80 W) por 36 min, enquanto que Pola *et al.* (2016) incorporou Cloisite®30B (2,5% m/m) em acetato de celulose usando ultrassons, durante 30 min (400 W). Estes autores encontraram padrões de DRX que sugeriram uma conformação intercalada ou esfoliada, corroborando os resultados apresentados neste trabalho. Desta forma, pode concluir-se que o processo de agitação utilizado na produção dos bioplásticos é capaz de aumentar a dispersão da montmorilonite no filme de quitosano e é viável para a produção de bio-nanocompósitos.

A incorporação das nanoargilas resultou em melhorias nas propriedades mecânicas dos bio-nanocompósitos, tal como esperado, não se verificando grandes alterações nas propriedades óticas (Tabela 4.6).

Tabela 4.6. Propriedades mecânicas e óticas dos filmes de quitosano incorporados com diferentes MMTs

Filme	L*	a*	b*	hue*	OPA (mm ⁻¹)	TM (MPa)	ME (MPa)	%E
Qui	75±3 ^{ab}	0,8±0,5 ^{bc}	37±2 ^{ab}	89±1 ^{ab}	3,7±0,3 ^a	17±1 ^b	340±11 ^c	31±4 ^a
Qui_MMTNa	74±3 ^{ab}	3,4±1,8 ^{ab}	42±3 ^a	86±2 ^b	6,4±0,6 ^a	31±0 ^a	806±19 ^{ab}	15±5 ^{ab}
Qui_MMTCa	71±2 ^b	5,5±1,4 ^a	44±2 ^a	83±2 ^c	6,9±1,8 ^a	29±2 ^a	966±162 ^a	11±1 ^b
Qui_MMT20	81±3 ^a	-0,3±0,8 ^c	29±6 ^b	91±2 ^a	5,4±0,8 ^a	29±2 ^a	714±45 ^b	24±11 ^{ab}

(a-c): médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

**Quitano (Qui); Montmorilonite (MMT); Opacidade (OPA); Tensão máxima na rotura (TM); Módulo de elasticidade (ME), %E (percentagem de alongação).

A resistência à tração e o módulo de elasticidade nos biopolímeros aumentaram significativamente ($p < 0,05$) por comparação com o filme controlo, enquanto que a percentagem de alongamento na rotura diminuiu como resultado

do alinhamento do material. As MMTs quando intercaladas ou esfoliadas em matrizes poliméricas são capazes de melhorar as propriedades mecânicas devido à forte interação entre o quitosano e o nanomaterial à medida que as ligações químicas são fortalecidas, resultando em um material mais resistente, menos flexível e rígido (Abdollahi, Rezaei e Farzi, 2012).

É importante assinalar que a incorporação das argilas não resultou em diferenças significativas na opacidade e cor final dos filmes ($p > 0,05$), exceto para o filme incorporado com MMTCa que apresentou coloração com tonalidade um pouco menos amarela e mais laranja (menor hue* - $p < 0,05$) e um pouco mais escura (Tabela 4.6).

4.3. Considerações finais

A seleção dos melhores extratos naturais a serem incorporados nos filmes deve ser baseada na capacidade dos mesmos de conferir atividade antioxidante aos biopolímeros, com menores alterações nas propriedades físicas do material. Desta forma, entre os extratos hidroalcoólicos e óleos essenciais, é notório que os últimos do ponto de vista da bioatividade acrescida foram melhores que os EHA (uma vez que foram os únicos em que houve migração dos compostos fenólicos com preservação da atividade antioxidante). Sendo assim, a seleção dos melhores extratos foi feita entre os cinco óleos essenciais avaliados. Ainda do ponto de vista da bioatividade, os OEs de destaque foram nesta ordem OEA, OES, OEG, OET e OEM. Atendendo a que o OEA e OES são obtidos de plantas da mesma família (*Lamiaceae*), optou-se desta forma pelo OEA e OEG para prosseguir com o estudo, de forma a estudar dois óleos obtidos de plantas de diferentes famílias, mas com elevada atividade quando incorporados no quitosano.

Entre as diferentes MMTs estudadas, não foram verificadas diferenças significativas entre as propriedades mecânicas, e todos os nanocompósitos apresentaram boa interação entre a argila e o polímero observada pelo DRX, sugerindo a obtenção de uma morfologia esfoliada, validando o processo de agitação mecânica utilizado para a produção dos filmes. Portanto, a escolha da melhor montmorilonite foi baseada na hidrofilicidade das nanoargilas testadas.

Tendo-se optado pelas argilas mais hidrofílicas, ou seja, as não modificadas, descartando-se a MMT20. Entre as duas argilas naturais hidrofílicas (MMTNa e MMTCa), apesar de se não ter observado diferenças significativas ($p>0,05$) nas propriedades mecânicas, a montmorilonite sódica (Cloisite®Na+) mostrou uma tendência de valores mais elevados de tensão máxima com alterações intermédias no alongamento e módulo de elasticidade, e menores alterações nas propriedades óticas (opacidade e valores de hue* mais próximos da amostra controle) (Tabela 4.6). Portanto, a MMTNa foi a montmorilonite escolhida para ser usada na continuação dos estudos. Além disso, a MMTNa por ser mais hidrofílica, pode interagir melhor com o quitosano do que com os óleos utilizados como compostos ativos, possibilitando a melhoria das propriedades funcionais dos biocompósitos ao mesmo tempo que possibilita uma libertação mais fácil dos compostos fenólicos para o alimento embalado (Dias *et al.*, 2014).

Desta forma, os novos filmes desenvolvidos na próxima etapa do estudo foram incorporados com 0%, 0,5%, 1% e 2% de OEA ou OEG, com ou sem o nanorreforço da MMTNa, e os resultados e discussão encontram-se descritos nos capítulos 5 e 6, respetivamente.

Parte dos resultados presentes neste capítulo já se encontram publicados em três artigos (Souza, Pires, *et al.*, 2018), (Souza, Rodrigues *et al.*, 2018) e (Souza *et al.*, 2017).

Resultados e Discussão

Bio-nanocompósito quitosano / montmorilonite sódica / óleo essencial de alecrim

Filmes transparentes de cor predominantemente amarela foram produzidos utilizando o método de agitação proposto no item 3.4. Não foi observada qualquer descontinuidade nas películas, assim como nenhum poro ou grânulo de material não disperso/dissolvido (Fig. 5.1).

5.1. Caracterização das propriedades funcionais dos filmes

5.1.1. Difractometria de Raios-X

Os resultados dos ensaios de DRX dos filmes de quitosano puro e incorporados com a montmorilonite sódica e o óleo essencial de alecrim em diferentes concentrações estão descritos na Figura 5.2.

O filme de quitosano sem incorporação de qualquer nanorreforço ou óleo essencial apresentou o pico cristalino característico em ângulo $2\Theta = 11,34^\circ$ e um amplo pico correspondendo a uma estrutura amorfa a $20,28^\circ$. Vários fatores interferem na cristalinidade do quitosano, tais como a sua origem e constituição molecular (i.e. grau de desacetilação e peso molecular) assim como o tratamento utilizado no seu processamento (Lavorgna, Piscitelli, Mangiacapra, e Buonocore,

2010). A configuração amorfa indica uma estrutura menos organizada devido à presença de ácido acético residual que pode dificultar a formação de pontes de hidrogénio intermoleculares ou intramoleculares no polímero de quitosano (Dias *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). O desaparecimento do pico característico cristalino a $2\Theta = 11,34^\circ$ nos filmes incorporados com MMTNa indicam que a argila reduziu ligeiramente a cristalinidade dos filmes (Lavorgna *et al.*, 2010), um indicativo também de que houve uma boa interação entre o polímero e a nanoargila (Abdollahi *et al.*, 2012a; Youssef, El-sayed, El-sayed, Salama, e Dufresne, 2016)

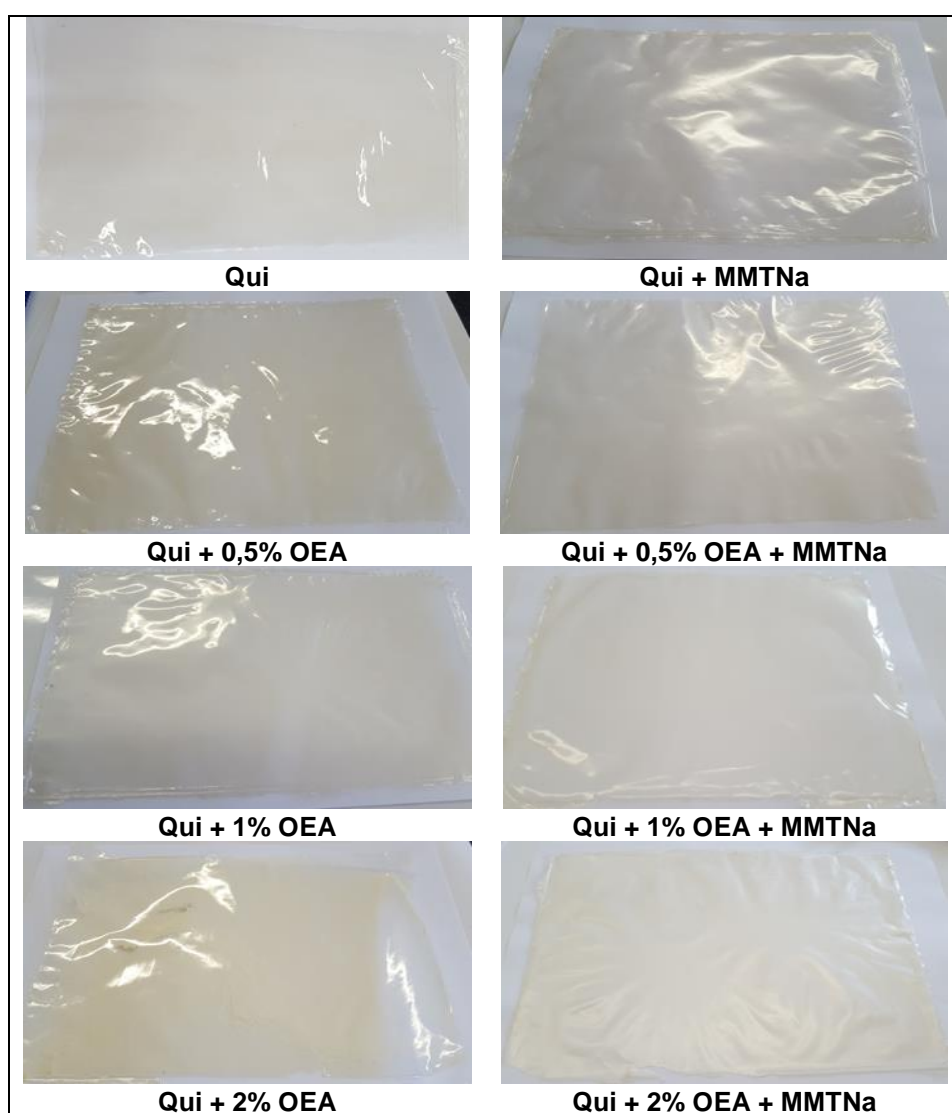


Figura 5.1. Bio-nanocompósitos produzidos. Qui (quitosano); OEA (óleo essencial de alecrim); MMTNa (montmorilonite sódica)

A MMTNa apresenta um pico de difração distinto num ângulo aproximado $2\Theta = 7,512^\circ$, correspondendo a uma distância interplanar das camadas individuais da MMT de $d_{001} = 1,18$ nm. De acordo com a discussão no capítulo 4, para os bio-nanocompósitos de Qui+MMTNa, o desaparecimento do pico de difração característico da argila é um forte indicador da obtenção de uma configuração totalmente esfoliada (Silvestre *et al.*, 2011). Outro pico cristalino foi encontrado em 2Θ próximos dos 20° e é correspondente ao d_{003} da argila, e quando incorporada nos filmes houve uma sobreposição da bossa presente no difratograma dos filmes de quitosano puro.

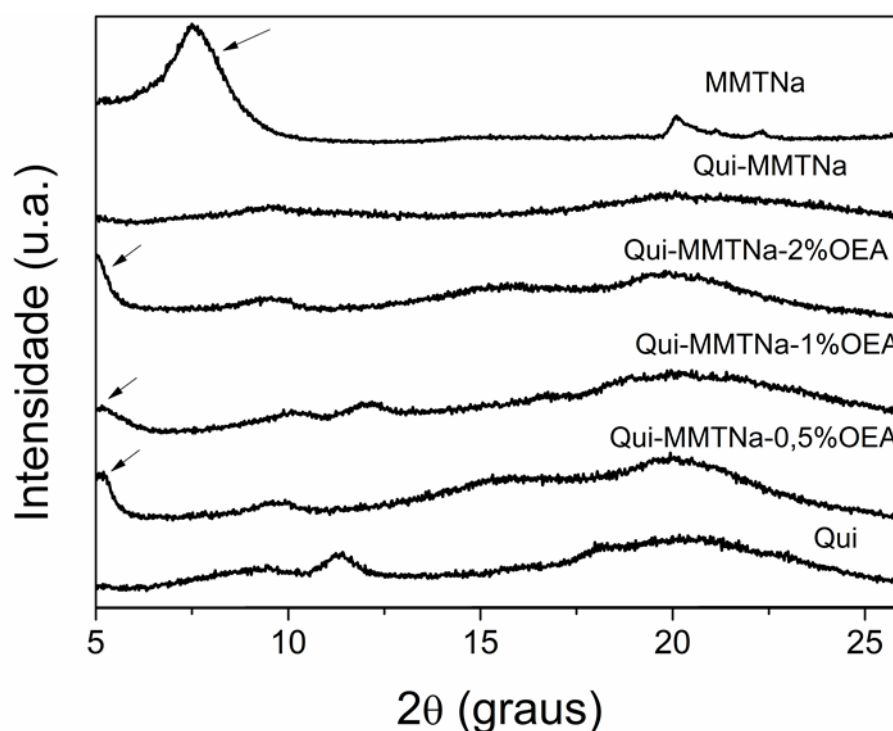


Figura 5.2. Difratogramas dos bio-nanocompósitos. Qui (quitosano); OEA (óleo essencial de alecrim); MMTNa (montmorilonite sódica).

A incorporação do OEA resultou no deslocamento do pico cristalino característico da nanoargila para ângulos menores em torno de $2\Theta = 5,20^\circ$ (0,5% OEA), $5,16^\circ$ (1% OEA) e $5,04^\circ$ (2% OEA), que de acordo com a Lei de Bragg, correspondem a um espaçamento interplanar d_{001} igual a 1,70; 1,71 e 1,75 nm respetivamente. O aumento do espaçamento interplanar da estrutura lamelar da argila (entre 44 e 48% superior que a MMTNa pura) é um indicativo de que o quitosano é capaz de intercalar-se entre as lâminas da MMTNa (Lavorgna *et al.*, 2010). A deslocação do pico de difração basal da MMTNa para ângulos inferiores

indica a obtenção de uma nano-estrutura intercalada (Wang *et al.*, 2015), desejada para melhorar as propriedades funcionais do material polimérico. Entretanto, a incorporação do OEA reduziu a dispersão do quitosano nas galerias de MMT, provavelmente devido a alterações na estrutura do polímero resultante da interação dos grupos reativos do polímero (grupos hidroxilo e amida) com os compostos fenólicos presentes no óleo essencial (Dias *et al.*, 2014). Os resultados obtidos estão de acordo com os reportados previamente por diversos autores (Dias *et al.*, 2014; Lavorgna *et al.*, 2010; Pola *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2015).

5.1.2. Caracterização morfológica / estrutural dos filmes

5.1.2.1. Microscopia eletrônica de varrimento (MEV)

As fotomicrografias da superfície e da secção transversal dos filmes estão dispostas nas Figuras 5.3 e 5.4, respetivamente.

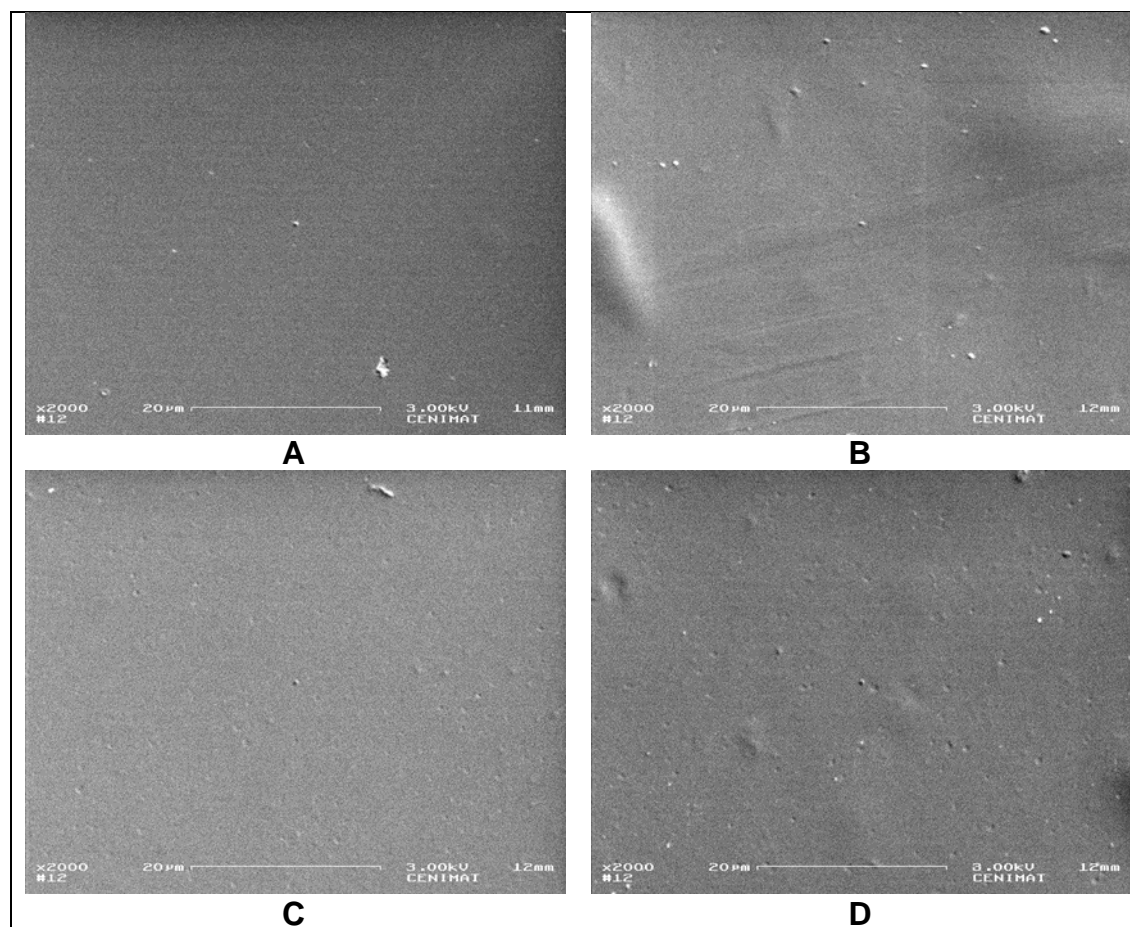


Figura 5.3. Fotomicrografias da topografia da superfície dos filmes: (A) quitosano; (B) quitosano + MMTNa; (C) quitosano + 2% OEA; (D) quitosano + 2% OEA + MMTNa. Ampliação de 1000x.

A superfície de todos os filmes apresentou elevada uniformidade (Fig. 5.3A, B, C e D). A incorporação da MMTNa ou do OEA com ou sem MMTNa não resultou em modificação relevante na homogeneidade do filme, tendo sido observado apenas alguns grânulos e pequenas depressões na superfície do material.

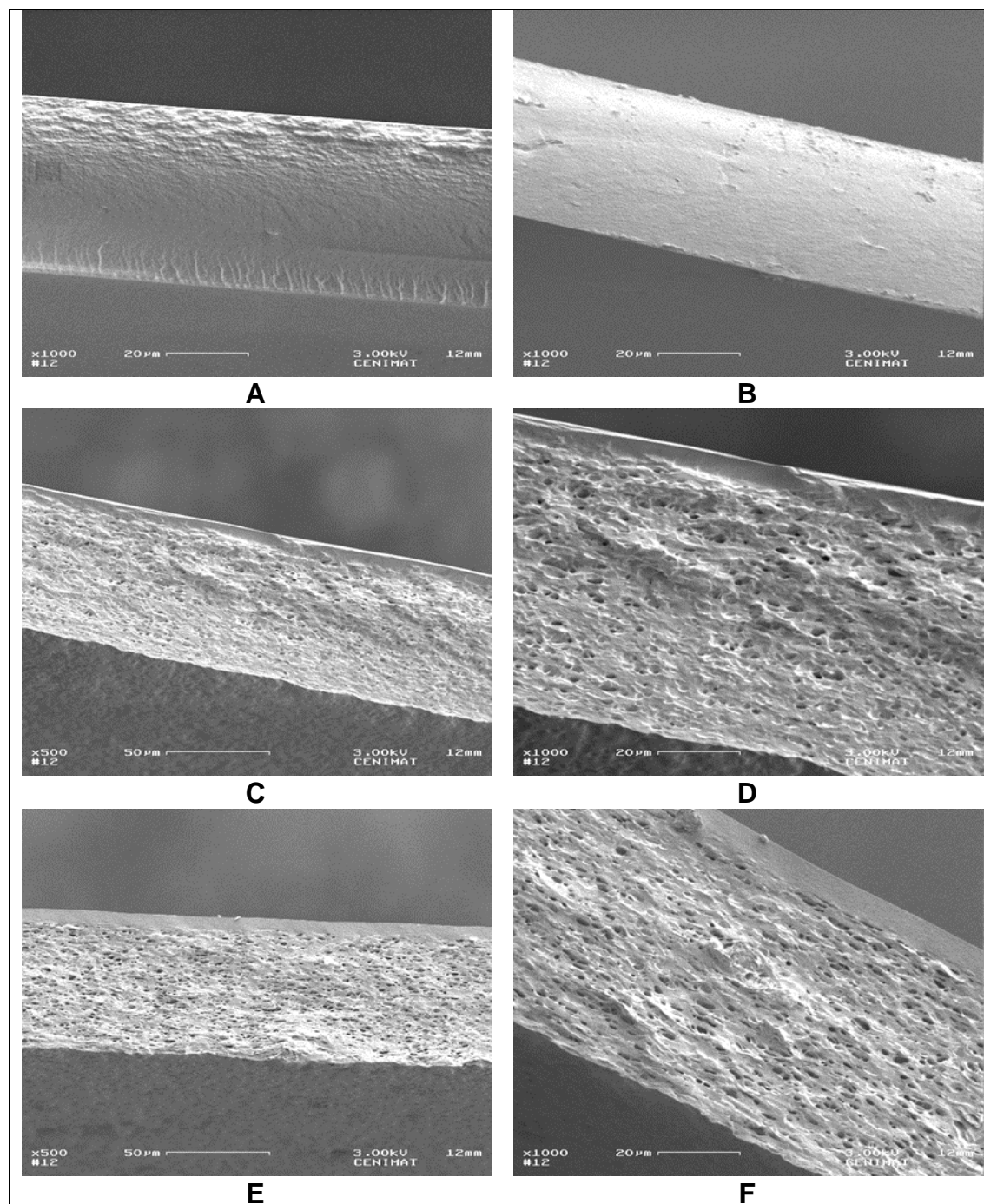


Figura 5.4. Fotomicrografias da secção transversal dos filmes: (A) quitosano; (B) quitosano + MMTNa; (C) quitosano + 2% OEA; (D) quitosano + 2% OEA; (E) quitosano + 2% OEA + MMTNa; (F) quitosano + 2% OEA + MMTNa. Ampliações 1000 x (A, B, D e F) e 500 x (C e E).

Os cortes transversais (realizados por meio de fraturas sob azoto) dos filmes controlo (Fig. 5.4A) e Qui + MMTNa (Fig. 5.4B) mostram elevada homogeneidade da estrutura polimérica obtida. A incorporação da MMTNa parece ter contribuído para tornar a rede ainda mais compacta, sendo um indício da obtenção de elevada interação quitosano x argila e corrobora os resultados de DRX. A incorporação do OEA na proporção de 2% resultou numa estrutura interna esponjosa (Fig. 5.4C e D). Quando foram adicionados ambos óleo e argila (Fig. 5.4E e F), a estrutura esponjosa parece ter diminuído um pouco, apesar de ainda estar presente. Desta forma, a MMTNa provavelmente resultou em uma melhor compactação da rede polimérica, o que indicará ter sido atingida uma boa interação entre os componentes do bio-nanocompósito.

O detalhe entre as imagens 5.4 C e D ou 5.4 D e F (os cortes com diferentes ampliações) ilustra a diferença da espessura dos filmes devido à incorporação do OEA. Na mesma magnificação dos filmes controlo e quitosano + MMTNa, a imagem não se enquadra na foto, entretanto com uma ampliação menor (500 vezes menor) foi possível visualizar o perfil do filme. Estes resultados corroboram com o que será discutido posteriormente no capítulo 6.1.5.

5.1.2.2. Microscopia eletrónica de transmissão (MET)

As imagens dos filmes obtidas por MET (Fig. 5.5) auxiliam no estudo do grau de esfoliação da nanoargila alcançado com o processo de agitação realizado, e permitem observar o tamanho, formato, organização e formação de agregados das nanopartículas na matriz polimérica (Pola *et al.*, 2016; Silvestre *et al.*, 2011).

A partir das imagens de MET confirma-se a configuração esfoliada / intercalada assumida pela MMTNa na rede do quitosano, apesar de a dispersão não ter sido completamente homogénea (verificam-se áreas sem a argila – registando-se uma concentração do nanomaterial em alguns pontos do filme), houve elevada interação, sendo possível observar que o polímero se encontra entre a estrutura da argila (partes mais claras da fotomicrografia). Estes resultados estão de acordo com a análise de DRX discutida anteriormente.

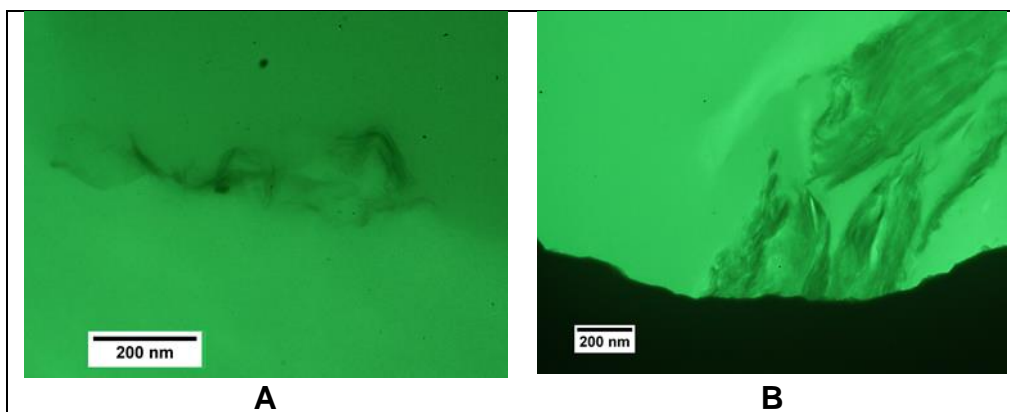


Figura 5.5. Fotomicrografias dos filmes obtidas por MET: (A) quitosano + MMTNa; (B) quitosano + MMTNa + 2% OEA. Ampliação de 50000x.

5.1.2.3. Microscopia de força atômica (MFA)

As imagens dos filmes obtidas por MFA estão dispostas na Figura 5.6. Observa-se claramente nos filmes com MMT uma maior rugosidade com partículas laminares de MMT que emergem da superfície do filme. A incorporação do OEA não resultou em grandes alterações na homogeneidade da superfície dos filmes, e de um modo geral os filmes apresentaram superfície homogênea.

5.1.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A técnica de FT-IR é muito utilizada para identificar a composição química de materiais assim como suas ligações intermoleculares em ciência dos materiais (Woranuch e Yoksan, 2013). Entre a gama de aplicações deste método analítico destaca-se a capacidade do estudo das interações entre os diferentes componentes presentes em materiais compósitos (Paluszkiewicz, Stodolak, Hasik, e Blazewicz, 2011; Pola *et al.*, 2016).

Espectros de FT-IR dos filmes de quitosano puro e dos compósitos incorporados com MMTNa e 2% de OEA estão ilustrados na Figura 5.7. Todos os espectros apresentaram as bandas de absorção características do quitosano: em 3325 cm^{-1} (-OH); 3265 cm^{-1} (estiramento assimétrico do grupo -NH); 2900 cm^{-1} (ligação C-H do grupo metilo -NHCOCH₃); 1637 cm^{-1} (amida I); 1550 cm^{-1} (amida II); 1342 cm^{-1} (vibração esquelética envolvendo o estiramento da ligação C-N da amida III); $1375\text{-}1408\text{ cm}^{-1}$ (-CH₂ dobramento); $906\text{-}1024\text{ cm}^{-1}$ (vibração

esquelética envolvendo o estiramento do grupo C–O) e 1134 cm^{-1} (estiramento assimétrico das pontes de C–O–C) (Ávila *et al.*, 2012; Silva-Weiss *et al.*, 2013; Woranuch e Yoksan, 2013). Não foram observadas grandes diferenças entre os espectros dos filmes com a incorporação tanto da argila quanto do OEA, tendo prevalecido os picos característicos do quitosano, provavelmente devido às pequenas quantidades incorporadas e à utilização do modo de leitura com atenuação total da reflectância.

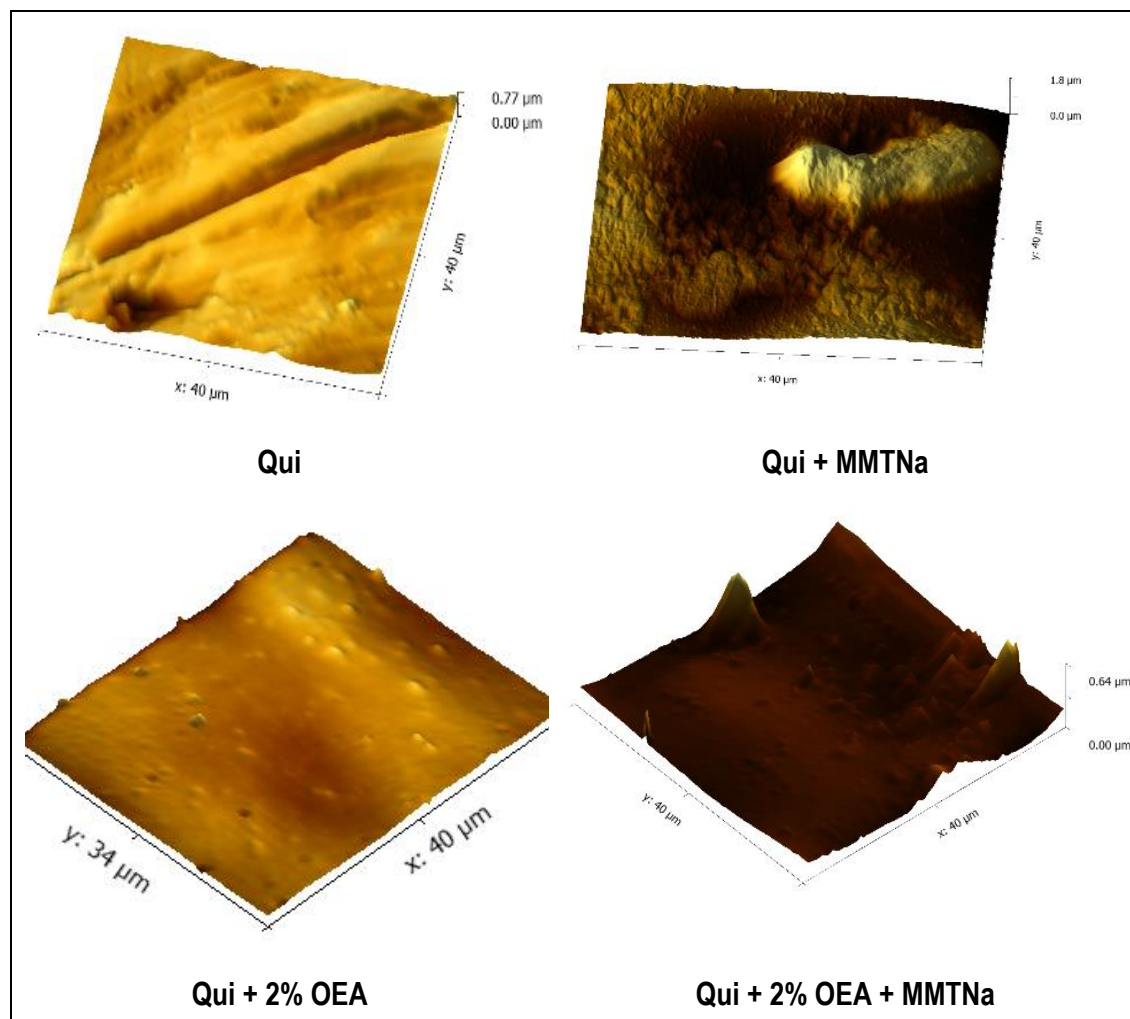


Figura 5.6. Fotomicrografias da topografia dos filmes obtidas por MFA.

A presença de múltiplos grupos funcionais (i.e. carboxilo, amida, hidroxilo e carbonilo) do quitosano proporciona a possibilidade de novas ligações entre o polímero e os nanomateriais ou compostos ativos possivelmente incorporados (Paluszkievicz *et al.*, 2011). A incorporação do OEA (Fig. 5.7C e D) provocou mudanças na intensidade das bandas de absorção em 1550 cm^{-1} (amida II) e entre 3331 e 2985 cm^{-1} , sugerindo a formação da ligação entre compostos

fenólicos presentes no óleo essencial e o quitosano, pois essas bandas correspondem ao estiramento do grupo hidroxila livre e ao alongamento assimétrico e simétrico das ligações NH no grupo amida (Silva-Weiss *et al.*, 2013).

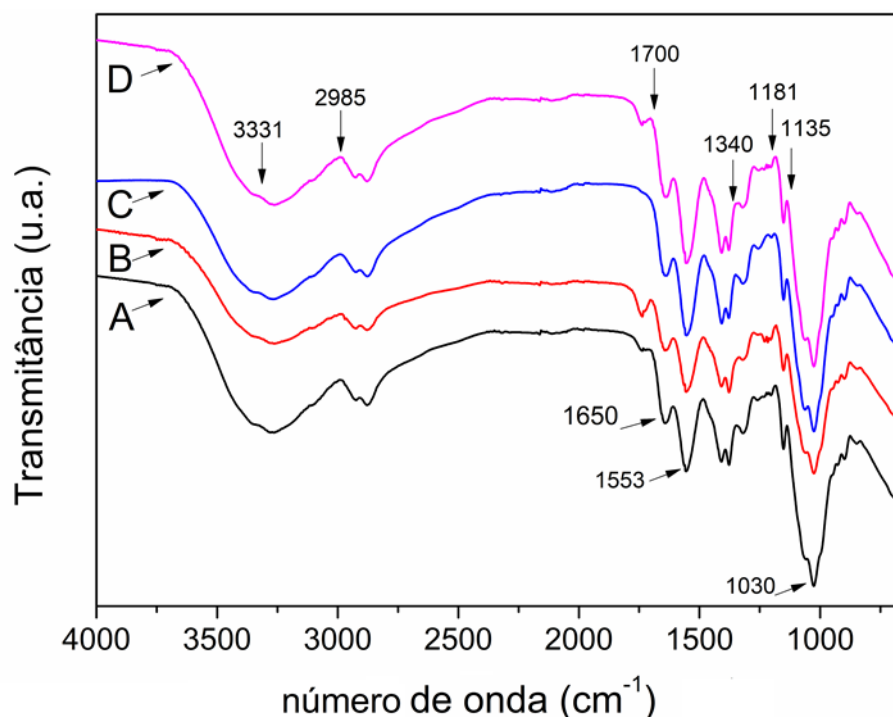


Figura 5.7. Espectro FT-IR dos bio-nanocompósitos. Filme quitosano (A); filme quitosano + MMTNa (B); filme quitosano + 2%OEA (C); filme quitosano + 2%OEA + MMTNa (D).

Para os espectros dos filmes com incorporação da MMTNa (Fig. 5.7B e D), as mudanças sutis observadas na intensidade das bandas em torno de 1030-1050 cm^{-1} e 1340 cm^{-1} podem ser atribuídas às vibrações das ligações de Si-O características da MMT incorporada (Paluszkiwicz *et al.*, 2011). Mudanças nas intensidades de pico nos espectros de FT-IR estão relacionadas com a sobreposição de vibrações, neste caso do grupo da amida secundária e Si-O, o que indica interações entre a matriz polimérica e a montmorilonite (Paluszkiwicz *et al.*, 2011; Pola *et al.*, 2016), corroborando os resultados anteriormente apresentados (DRX, propriedades mecânicas, óticas, de permeabilidade, entre outras).

De acordo com Pola *et. al* (2016) a incorporação do óleo essencial em biopolímeros resulta num aumento como um todo da intensidade dos espectros de absorção dos filmes. Neste trabalho os autores desenvolveram filmes de acetato de celulose incorporados com óleo essencial de orégãos e verificaram este comportamento. Esta mudança correspondeu a uma boa interação entre os

compostos ativos e a matriz polimérica que dificultou o movimento vibracional alterando a intensidade das bandas (Pola *et al.*, 2016). Comportamento similar pode ser observado nos espectros dos bio-nanocompósitos desenvolvidos com incorporação do OEA nas bandas de absorção localizadas entre 1650 a 1135 cm^{-1} (Fig. 5.7C e D). Além disso, a diminuição da intensidade de absorção das bandas em 3450 e 3310 cm^{-1} , correspondendo aos grupos NH_2 , reflete a redução na quantidade de grupos amina por unidade de volume capaz de formar pontes de hidrogénio intermoleculares com grupos OH primários do polissacárido (Afanas'eva *et al.*, 2013), demonstrando o bom aprisionamento dos compostos fenólicos na matriz de quitosano por meio das ligações químicas formadas.

5.1.4. Avaliação das propriedades térmicas

As propriedades térmicas foram estudadas por meio das análises de DSC e TGA com a determinação das temperaturas de transição vítrea e das perdas de massa (decomposição térmica), respetivamente. Os resultados encontram-se na Tabela 5.1 e Figura 5.8.

Estudos da temperatura de relaxamento correspondente à Tg de filmes de quitosano são poucos, e muitas vezes contraditórios, não tendo sido definida uma temperatura de transição vítrea para este material (Afanas'eva *et al.*, 2013; Sakurai, 2000). Resultados da Tg para filmes de quitosano são reportados na literatura variando entre 70 °C e 205 °C (Afanas'eva *et al.*, 2013; Beigzadeh Ghelejlu, Esmaili, e Almasi, 2016; Günister, Pestreli, Ünlü, Atıcı, e Güngör, 2007; Sakurai, 2000; Zhang e Kosaraju, 2007). Fatores relacionados com o material utilizado (origem, peso molecular e grau de desacetilação do quitosano) e o teor de água residual na matriz polimérica afetam diretamente os valores Tg (Afanas'eva *et al.*, 2013).

O valor de Tg encontrado para o filme puro de quitosano foi de 206,7 °C (Tabela 5.1). Temperaturas similares são reportadas na literatura, 203 °C (Sakurai, 2000) e 205 °C (Afanas'eva *et al.*, 2013), em linha com o valor aqui reportado. A incorporação da MMTNa não resultou em diferenças significativas ($p>0,05$) na temperatura de transição vítrea, no entanto, foi observada uma

tendência de redução da Tg com a incorporação da argila (Tg do filme de quitosano + MMTNa = 188,9 °C).

Filmes de quitosano incorporados com 1% ou 3% de MMTNa também apresentaram menores valores de Tg (Beigzadeh Ghelejlou *et al.*, 2016). De acordo com estes autores, as atrações intermoleculares entre as moléculas de quitosano na matriz polimérica provavelmente poderão ter sido interrompidas pela incorporação das argilas carregadas, o que resultou num ganho de mobilidade da cadeia polimérica e consequentemente na diminuição da Tg (Beigzadeh Ghelejlou *et al.*, 2016). Esta possível maior mobilidade das cadeias de quitosano com a incorporação da nanoargila corrobora os resultados mecânicos, o aumento da percentagem de alongamento na rotura e o menor módulo de elasticidade apresentados.

Em relação à incorporação do OEA, a temperatura de transição vítrea dos bio-nanocompósitos também não sofreu variações estatisticamente significativas ($p>0,05$) com a incorporação do OEA. A única exceção foi para os filmes incorporados com a maior concentração de óleo testada (2%OEA) e com a MMTNa ($p<0,05$). Beigzadeh Ghelejlou, Esmaili e Almasi (2016) também não observaram mudanças na Tg de filmes de quitosano reforçados com MMTNa devido a incorporação de extratos naturais ricos em polifenóis em diferentes concentrações.

Tabela 5.1. Temperatura de transição vítrea, temperaturas de degradação térmica e perdas de massa dos bio-nanocompósitos.

Filme	T _g (°C)*	Δ1		Δ2		Δ3		Δ4		Resíduo (%)
		T _d (°C)	ΔM (%)	T _d (°C)	ΔM (%)	T _d (°C)	ΔM (%)	T _d (°C)	ΔM (%)	
Qui**	206,7 ± 3,7 ^B	70,9±2,5	6,5±0,0	170,1±1,5	12,6±0,8	283,6±0,7	24,3±0,6	-	-	23,6±0,4
Qui+MMTNa	188,9± 6,7 ^B	63,6±2,4	6,4±0,8	173,2±0,8	14,0±0,8	283,5±0,5	23,2±0,2	-	-	25,8±0,1
Qui+0,5%OEA	193,4± 6,6 ^B	59,4±0,3	6,1±0,1	166,7±0,2	13,7±0,1	282,1±0,0	21,6±0,2	427,8±14,5	27,3±1,5	21,6±0,2
Qui+0,5%OEA+MMTNa	201,6± 8,2 ^B	63,3±1,1	6,5±0,1	172,6±0,6	13,7±0,3	285,2±0,7	22,6±0,6	430,5±4,6	24,3±0,7	23,6±0,2
Qui+1%OEA	192,9± 6,3 ^B	62,3±2,0	6,1±0,2	170,6±3,0	13,0±0,3	284,8±0,5	20,7±0,2	415,6±2,8	30,7±0,1	19,2±0,4
Qui+1%OEA+MMTNa	203,3± 6,2 ^B	63,6±0,1	6,1±0,2	173,3±4,9	13,0±1,1	285,8±0,9	20,8±0,6	417,2±3,3	29,5±0,2	20,7±0,7
Qui+2%OEA	193,9± 4,7 ^B	70,5±9,5	4,2±1,3	172,9±37	12,5±2,5	292,3±1,8	26,8±1,6	405,5±4,4	28,6±1,6	17,4±0,3
Qui+2%OEA+MMTNa	228,1± 8,3 ^A	60,1±1,2	5,7±0,4	186,2±1,2	17,1±0,5	293,8±1,3	22,8±1,1	407,8±4,3	23,7±0,9	19,4±0,3

*(A-B): Médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$);

**Montmorilonite sódica (MMTNa); óleo essencial de alecrim (OEA); Temperatura de transição vítrea (T_g); Temperatura de decomposição (T_d); Perda de massa (ΔM).

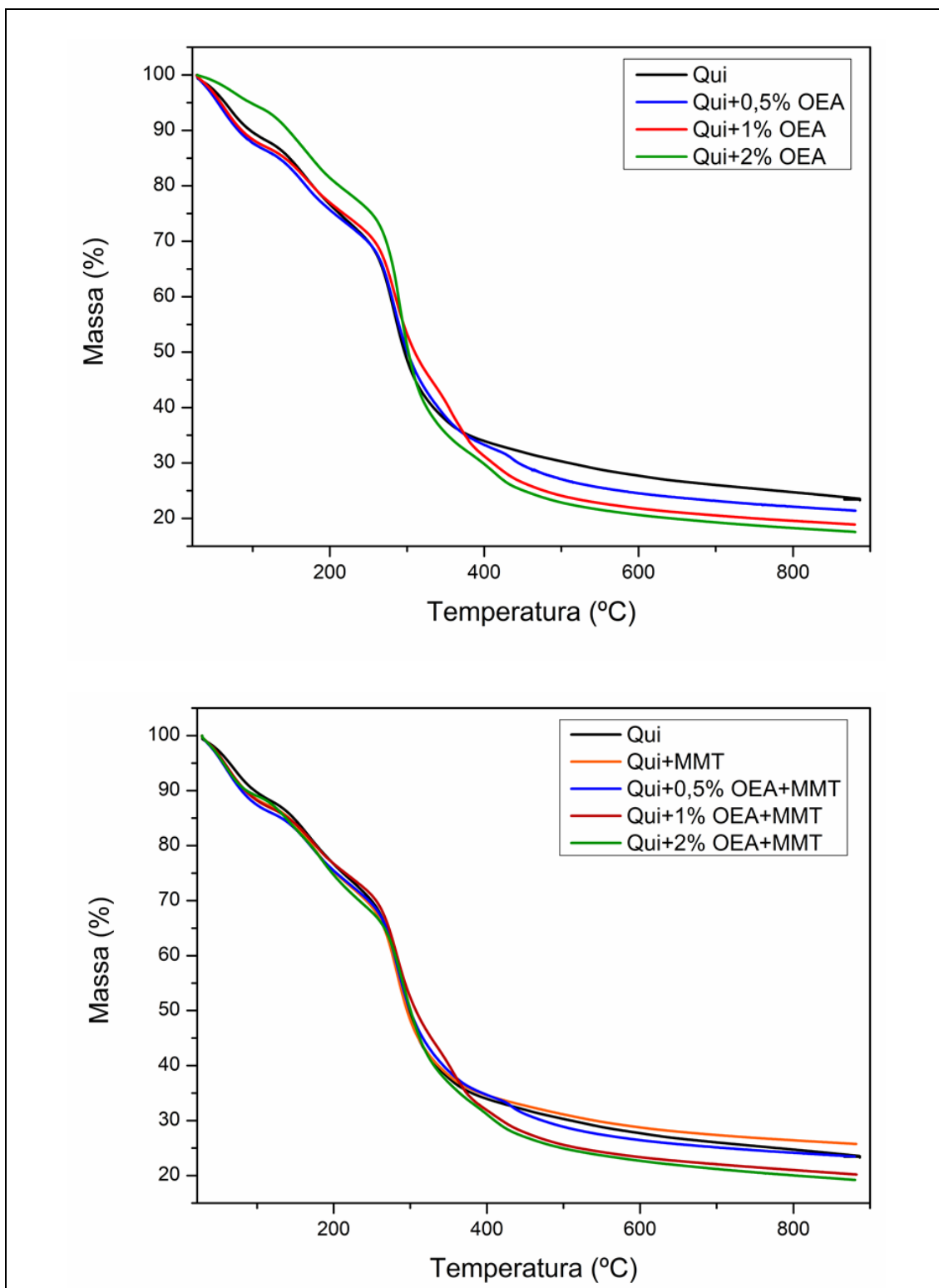


Figura 5.8. Análise termogravimétrica dos bio-nanocompósitos – perda de massa em função da temperatura. Qui (quitosano); OEA (óleo essencial de alecrim); MMT (montmorilonite sódica).

De um modo geral, apesar de não significativa, a tendência observada foi de diminuição da Tg dos filmes quando incorporados apenas com o OEA, e um aumento da temperatura quando MMTNa também foi adicionado ao sistema.

A redução da mobilidade das cadeias devido às interações entre o quitosano, a nanoargila e os compostos fenólicos presentes no OEA explicam o aumento da temperatura de transição vítrea (Chivrac, Pollet, e Avérous, 2009). A diminuição da Tg reflete a maior mobilidade da cadeia polimérica do compósito, provavelmente devido ao efeito plastificante que o óleo essencial conferiu ao sistema (Beigzadeh Ghelejlou *et al.*, 2016), corroborando os resultados mecânicos apresentados. É sabido que a temperatura de transição vítrea de polímeros diminui com o aumento do conteúdo de plastificantes (Sakurai, 2000).

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica onde a massa de uma substância é monitorizada em função do aumento da temperatura sob condições controladas de temperatura e atmosfera (geralmente sob fluxo de azoto, um gás inerte) (Woranuch e Yoksan, 2013). As temperaturas de degradação térmica (Td), perdas de massa (% Δ M) e o resíduo das amostras dos filmes (%) estão descritos na Tabela 5.1.

Os filmes de quitosano sem adição do OEA (tratamentos controlo e Qui + MMTNa) apresentaram três estágios principais de degradação térmica (Tabela 5.1), enquanto que para os demais biopolímeros foram observadas quatro temperaturas de degradação (Fig. 5.8). Um comportamento similar foi observado em filmes de quitosano incorporados ou não com óleo essencial de *Satureja hortensis* (Alizadeh *et al.*, 2018).

O primeiro estágio de degradação observado em Td1 (59,4-70,9 °C) com uma perda de massa variando entre 4,2-6,5% corresponde à evaporação do ácido acético e da água residuais presentes nos filmes. O segundo estágio da perda de massa corresponde provavelmente à degradação de componentes de baixo peso molecular ou estruturalmente ligados a água na rede polimérica do quitosano (Alizadeh *et al.*, 2018). O terceiro estágio de degradação térmica, último observado para os filmes onde não foi incorporado o OEA, ocorreu a temperaturas entre 282,1-293,8 °C, e está associado à desidratação do anel

sacárido, à despolimerização e decomposição pirolítica das unidades acetiladas ou desacetiladas do quitosano (Alizadeh *et al.*, 2018; Lavorgna *et al.*, 2010), ou seja, à degradação do quitosano. Resultados semelhantes são reportados na literatura para filmes de quitosano com e sem incorporação de óleos essenciais ou nanoargilas (Alizadeh *et al.*, 2018; Casariego *et al.*, 2009; Rimdusit, Jingjid, Damrongsakkul, Tiptipakorn, e Takeichi, 2008). O quarto e último estágio de degradação térmica aconteceu entre 405,5-430,5 °C apenas para os filmes com OEA. Este estágio estará relacionado com a degradação dos compostos termicamente estáveis presentes no OEA, como também observado por Alizadeh *et al.* (2018).

De um modo geral a incorporação da nanoargila resultou num ligeiro aumento da estabilidade térmica dos filmes, o que é facilmente observado no terceiro estágio de degradação onde todos os filmes nanorreforçados em comparação com seu par sem incorporação da MMT apresentaram temperaturas ligeiramente superiores. O aumento da estabilidade térmica induzido pela adição de argilas em compósitos poliméricos é comumente observado, e está relacionado com o nível de dispersão e do fator de forma (razão entre o comprimento e a espessura das lâminas da argila) obtida (Chivrac *et al.*, 2009). A esfoliação/intercalação das camadas da argila entre a matriz polimérica aumentam a tortuosidade no percurso de difusão dos gases de combustão (barreira ao transporte), favorecendo a formação de uma proteção na superfície do material (carvão – isolante térmico), contribuindo para aumentar as temperaturas de degradação (Chivrac *et al.*, 2009; Darder *et al.*, 2003).

Os resíduos da decomposição térmica observados no final do ciclo de aquecimento até os 900 °C dos filmes incorporados com OEA diminuíram em comparação com o controlo, enquanto que nos biopolímeros reforçados com a MMT registou-se um aumento da quantidade de cinzas. Comportamentos similares foram reportados na literatura, Alizadeh *et al.* (2018) observaram a diminuição do resíduo mineral com a incorporação de óleo essencial em filmes de quitosano, enquanto que Rimdusit *et al.* (2008) registaram um ligeiro aumento da quantidade de cinzas em biopolímeros de metil celulose incorporados com montmorilonite, e atribuíram este aumento à característica inorgânica da argila.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que houve uma boa interação entre os componentes dos bio-nanocompósitos produzidos, e corroboram as demais caracterizações realizadas na caracterização do material.

5.1.5. Avaliação da espessura e propriedades mecânicas

A espessura dos filmes não foi afetada pela incorporação da MMTNa ($p > 0,05$) (Tabela 5.2). Alguns fatores podem explicar estes resultados, como: a boa dispersão da MMTNa devido a obtenção da estrutura esfoliada; a formação de fortes interações entre cadeias da argila e o polímero; e a penetração das cadeias de quitosano entre os espaçamentos das galerias da MMT (Beigzadeh Ghelejlou *et al.*, 2016), resultando numa estrutura compacta, sem aumento da espessura dos filmes, que corroboram os resultados da DRX.

Tabela 5.2. Espessura e propriedades mecânicas dos bio-nanocompósitos sem (Controlo) ou com incorporação de montmorilonite sódica (MMTNa) e óleo essencial de alecrim (OEA).

OEA (%)	Espessura (μm)		TM** (MPa)	
	0% MMTNa	2,5% MMTNa	0% MMTNa	2,5% MMTNa
0	41,7 \pm 2,9 ^{aC*}	39,5 \pm 2,0 ^{aC}	46,7 \pm 1,7 ^{bB}	66,6 \pm 3,1 ^{aA}
0,5	50,3 \pm 1,1 ^{aB}	42,2 \pm 1,3 ^{bC}	51,8 \pm 2,0 ^{aA}	49,9 \pm 3,0 ^{aB}
1,0	49,1 \pm 1,7 ^{aB}	50,4 \pm 1,2 ^{aB}	49,7 \pm 0,8 ^{aAB}	49,7 \pm 0,3 ^{aB}
2,0	66,9 \pm 2,5 ^{aA}	68,5 \pm 1,0 ^{aA}	34,3 \pm 0,9 ^{bC}	44,6 \pm 1,0 ^{aC}
OEA (%)	%E		ME (GPa)	
	0% MMTNa	2,5% MMTNa	0% MMTNa	2,5% MMTNa
0	17,9 \pm 1,2 ^{bB}	33,5 \pm 2,5 ^{aA}	2,05 \pm 0,19 ^{aA}	1,86 \pm 0,14 ^{aA}
0,5	29,5 \pm 2,6 ^{aA}	32,7 \pm 2,0 ^{aA}	1,54 \pm 0,02 ^{aB}	1,04 \pm 0,03 ^{bC}
1,0	27,8 \pm 0,5 ^{aA}	27,2 \pm 0,1 ^{aB}	1,43 \pm 0,05 ^{bB}	1,79 \pm 0,03 ^{aA}
2,0	27,5 \pm 2,1 ^{bA}	31,6 \pm 1,2 ^{aA}	0,83 \pm 0,07 ^{bC}	1,45 \pm 0,07 ^{aB}

*(A-C) Entre cada parâmetro, médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$); (a-b) Entre cada parâmetro, médias na mesma linha seguidas por diferentes letras diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

** Tensão máxima na rotura (TM); Módulo de elasticidade (ME), %E (percentagem de alongamento).

Por outro lado, o aumento da concentração do OEA nos filmes resultou num aumento da espessura ($p < 0,05$), coerente com o maior conteúdo de sólidos por unidade de superfície (Perdones *et al.*, 2014). Adicionalmente, a interação entre os compostos fenólicos presentes no OEA e o quitosano podem ter reduzido o alinhamento do polímero, aumentando as distâncias espaciais entre as moléculas de quitosano, e desta forma, originar a obtenção de uma matriz

polimérica menos compacta, ou seja, mais espessa (Beigzadeh Ghelejlou *et al.*, 2016). Estes resultados estão de acordo com os observados por outros autores em filmes incorporados com extratos ricos em compostos fenólicos (Beigzadeh Ghelejlou *et al.*, 2016; Perdonés, Chiralt, e Vargas, 2016; Perdonés *et al.*, 2014).

Em relação aos ensaios mecânicos, a incorporação da nanoargila melhorou as propriedades mecânicas dos biopolímeros obtendo-se um aumento da tensão máxima antes da rotura (Tabela 5.2). Os óleos essenciais, por outro lado, diminuíram a resistência dos filmes diminuindo sua tensão máxima, tendo atuado como plastificantes tornando o material mais plástico e elástico.

Mais uma vez, a melhoria na resistência dos filmes devida a incorporação da MMTNa pode ser atribuída à dispersão uniforme da nanoargila na matriz do quitosano (isto é obtenção de conformações esfoliadas ou intercaladas) e à forte interação entre o polímero e a montmorilonite. É sabido que a incorporação de montmorilonite em concentrações inferiores a 5% resulta em melhorias na resistência dos filmes (Abdollahi *et al.*, 2012a; Beigzadeh Ghelejlou *et al.*, 2016; Lavorgna *et al.*, 2010). A diminuição da RM com a incorporação do OEA provavelmente ocorreu devido a alguma agregação de partículas de MMT com elevada energia superficial (Ghanbarzadeh, Oleyaei, e Almasi, 2015) que alteraram a MMT de esfoliada para configuração intercalada como discutido anteriormente nos resultados de DRX.

Nos filmes sem o nanorreforço, houve um aumento significativo na percentagem de alongamento na rotura e uma diminuição no módulo de elasticidade devido à incorporação do OEA ($p < 0,05$) (Tabela 5.2). Mais uma vez, o óleo teve o efeito plastificante nos biopolímeros produzidos. Este comportamento pode ser atribuído à possível interação entre os compostos fenólicos do OEA e os grupos amina do quitosano por meio de ligações cruzadas covalentes que levam à formação de matrizes mais coesas e flexíveis (Bitencourt, Fávaro-Trindade, Sobral, e Carvalho, 2014). Nos filmes onde também foi incorporada a MMTNa, esse efeito plastificante do OEA sobre o quitosano não foi tão significativo. A presença do óleo em pequenas quantidades talvez modifique a rede de ligação de hidrogénio dentro do material, permitindo uma melhor interação entre a

montmorilonite e o quitosano (Abdollahi *et al.*, 2012a). Abdollahi, Rezaei e Farzi (2012) e Beigzadeh Ghelejlou, Esmaili e Almasi (2016) também observaram um comportamento semelhante nas propriedades mecânicas de biopolímeros reforçados com montmorilonite e incorporados com extratos naturais ricos em compostos fenólicos.

5.1.6. Avaliação das propriedades de barreira dos filmes – permeabilidade do vapor de água e do oxigênio (PVA e PO)

Entre as principais funções das embalagens alimentares destaca-se a capacidade de conter o alimento embalado, protegendo-o do ambiente externo (contaminantes microbiológicos, luz, gases, humidade, entre outros fatores), e desta forma, extendendo a vida de prateleira do mesmo (Soares *et al.*, 2009). No processo de desenvolvimento de novos materiais de embalagem, o estudo das propriedades de barreira é fundamental, visto que embalagens com menores permeabilidades do vapor de água e dos gases são sempre desejadas (Vilarinho *et al.*, 2018).

A permeabilidade do vapor de água (PVA) e do oxigênio (PO) não foi estatisticamente afetada ($p > 0,05$) devido à incorporação da MMTNa ou do OEA, exceto para os filmes incorporados com 2% do óleo, com ou sem o nanorreforço, que apresentaram um aumento significativo em ambas as permeabilidades em relação ao filme controlo (Tabela 5.3), e o filme de quitosano + MMTNa que apresentou menor PO do que o filme controlo ($p < 0,05$). Embora as diferenças entre os tratamentos não se tenham diferenciado estatisticamente entre si, duas tendências podem ser observadas, nomeadamente: (i) diminuição das propriedades de barreira com a incorporação do OEA (aumento das permeabilidades); e (ii) aumento com a incorporação do MMT (diminuição das permeabilidades).

Era esperado que, com a incorporação do óleo essencial de alecrim (de carácter hidrofóbico), a PVA diminuísse devido à redução do conteúdo hidrofílico do compósito formado (Giannakas, Patsaoura, Barkoula, e Ladavos, 2017). Entretanto, o oposto foi observado, ou seja, observou-se uma tendência de aumento da PVA com a incorporação do OEA, embora sem significância estatística ($p > 0,05$) (Tabela 5.3). Mais uma vez, o óleo essencial pode ter atuado como

plastificante (comportamento também refletido nas propriedades mecânicas do material, discutido anteriormente), aumentando a mobilidade das cadeias poliméricas do quitosano, e consequentemente facilitando o transporte de oxigênio ou das moléculas de água através do filme (Nouri *et al.*, 2017), o que provavelmente explica os resultados encontrados. Por outro lado, a presença de silicato em camadas dispersas no polímero cria uma maior tortuosidade no percurso que os gases precisam de percorrer para permear a embalagem, dificultando a permeação tanto do oxigênio quanto do vapor de água (Giannakas *et al.*, 2017; Rhim *et al.*, 2006), ou seja, reduzindo-se a permeabilidade, como também relatado anteriormente na literatura (Abdollahi *et al.*, 2012a; Giannakas *et al.*, 2017; Nouri *et al.*, 2017).

Tabela 5.3. Permeabilidades do vapor de água e do oxigênio dos bio-nanocompósitos.

Filme	PVA (10^{-11} mol/m·s·Pa)	PO (10^{-16} mol/m·s·Pa)
Qui**	$1,40 \pm 0,09^{\text{B*}}$	$0,184 \pm 0,052^{\text{B}}$
Qui+MMTNa	$1,75 \pm 0,10^{\text{AB}}$	$0,098 \pm 0,008^{\text{C}}$
Qui+0,5% OEA	$1,78 \pm 0,25^{\text{AB}}$	$0,212 \pm 0,091^{\text{B}}$
Qui+MMTNa+0,5% OEA	$1,90 \pm 0,22^{\text{AB}}$	$0,134 \pm 0,019^{\text{BC}}$
Qui+1% OEA	$2,10 \pm 0,54^{\text{AB}}$	$0,227 \pm 0,017^{\text{B}}$
Qui+MMTNa +1% OEA	$1,87 \pm 0,07^{\text{AB}}$	$0,203 \pm 0,024^{\text{B}}$
Qui+2% OEA	$2,54 \pm 0,51^{\text{A}}$	$0,252 \pm 0,035^{\text{B}}$
Qui+MMTNa+2% OEA	$2,36 \pm 0,18^{\text{A}}$	$0,416 \pm 0,049^{\text{A}}$

*(A-B): Médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$);

**Montmorilonite sódica (MMTNa); óleo essencial de alecrim (OEA); Permeabilidade do vapor de água (PVA); Permeabilidade do oxigênio (PO).

Os valores de PVA e PO obtidos têm a mesma ordem de grandeza referida para filmes de quitosano em diferentes trabalhos (PVA = $4,14 \times 10^{-11}$ mol/m·s·Pa (Ferreira *et al.*, 2016); $1,50 \times 10^{-11}$ mol/m·s·Pa (Liu, Cai, Jiang, Wu, e Le, 2016); $0,67 \times 10^{-11}$ mol/m·s·Pa (Pastor *et al.*, 2013) e PO = $2,35 \times 10^{-16}$ mol/m·s·Pa (Ferreira *et al.*, 2016); $0,07 \times 10^{-16}$ mol/m·s·Pa (Pastor *et al.*, 2013)).

Em comparação com os filmes tradicionais, derivados do petróleo, muito utilizados na indústria alimentar (por exemplo, o PEBD cuja PVA = $0,01 \times 10^{-11}$ mol/m·s·Pa (Ferreira *et al.*, 2014)), a permeabilidade do vapor de água em filmes de quitosano é no mínimo cerca de duas ordens de grandeza de valor superior. A elevada permeabilidade do vapor de água em filmes de quitosano está

relacionada com o caráter hidrofílico deste polissacárido. Esta característica pode ser limitante no uso destas películas pela indústria alimentar, restringindo a sua aplicação a embalagem de alimentos com menor teor de água ou utilizando-as como uma camada interna intercalada entre outros materiais hidrofóbicos para alimentos com elevados teores de água (Ferreira, Bandarra, Moldão-Martins, Coelho, e Alves, 2018).

Por outro lado, relativamente ao oxigénio, os filmes de quitosano apresentaram excelentes barreiras a este gás. Os valores de POs encontrados neste trabalho são comparáveis com os reportados para EVOH ($0,24 \times 10^{-16}$ mol/m·s·Pa (Cerisuelo, Alonso, Aucejo, Gavara, e Hernández-Muñoz, 2012)), um dos materiais usados em embalagens alimentares com melhor barreira ao oxigénio (Lagaron, Catalá, e Gavara, 2004). Destacando-se o potencial destas películas como agentes protetores contra processos oxidativos comumente responsáveis pela deterioração dos alimentos.

5.1.6. Avaliação das propriedades óticas

De um modo geral, as propriedades óticas foram alteradas principalmente devido a incorporação do OEA (Tabela 5.4). Os bio-nanocompósitos apresentaram maiores opacidades, saturação na cor (aumento na cromaticidade) e tonalidade amarela com a incorporação do OEA. De acordo com Siripatrawan e Harte (2010), a incorporação de extratos naturais ricos em compostos fenólicos contribui para alterar/adicionar cor aos filmes. Desta forma, a cor dos filmes é diretamente influenciada pelo tipo e concentração dos compostos incorporados no polímero, que se ligam estruturalmente à suspensão filmogénica (Moradi *et al.*, 2012) modificando as propriedades do material.

Perdones e colaboradores (2016) obtiveram filmes de quitosano incorporado com óleos essenciais de tomilho e manjerição e observaram aumento na cromaticidade e diminuição do hue* com a adição dos OEs. De acordo com estes autores, estas mudanças são atribuídas à formação de cristais dos compostos incorporados que interferem na reflexão da luz (Pastor *et al.*, 2013; Perdones *et al.*, 2016).

Tabela 5.4. Resumo das propriedades óticas dos bio-nanocompósitos.

OEA** (%)	Cromaticidade		Opacidade (mm ⁻¹)		hue* (graus)	
	0% MMTNa	2,5% MMTNa	0% MMTNa	2,5% MMTNa	0% MMTNa	2,5% MMTNa
0	3,1 ± 0,1 ^{bD*}	4,2 ± 0,4 ^{aC}	1,1 ± 0,2 ^{aD}	1,7 ± 0,3 ^{aD}	129 ± 1,0 ^{aA}	119 ± 1,8 ^{bA}
0,5	7,6 ± 0,5 ^{aB}	6,7 ± 0,1 ^{bB}	3,1 ± 0,1 ^{aC}	2,8 ± 0 ^{aB}	111 ± 0,3 ^{aB}	111 ± 0,1 ^{aB}
1,0	6,7 ± 0,1 ^{bC}	7,5 ± 0,5 ^{aB}	5,4 ± 0,4 ^{bB}	7,5 ± 0,7 ^{aB}	112 ± 0,6 ^{aB}	110 ± 0,8 ^{bB}
2,0	12,1 ± 0,4 ^{aA}	8,3 ± 0,3 ^{bA}	6,9 ± 0,3 ^{bA}	9,7 ± 0,3 ^{aA}	109 ± 0,3 ^{aC}	109 ± 0,2 ^{aB}

*(A-D) Entre cada parâmetro, médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$); (a-b) Entre cada parâmetro, médias na mesma linha seguidas por diferentes letras diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

**Montmorilonite sódica (MMT); óleo essencial de alecrim (OEA).

Em relação a opacidade, o incremento neste valor com a incorporação do OEA é provavelmente devido à interação entre o óleo e as moléculas de água presentes na matriz polimérica, que modifica o índice de refração do material, afetando a sua transparência e por consequência a sua opacidade (Sánchez-González, Chiralt, González-Martínez, e Cháfer, 2011).

A incorporação da MMTNa resultou em variações estatísticas nas coordenadas a^* e b^* ($p < 0,05$) dos filmes (valores não reportados), o que explica o menor valor de hue^* e maior opacidade do filme Qui+MMTNa quando comparado com o controle (apesar de apenas para o parâmetro hue^* ter havido significância estatística ($p < 0,05$)). Comportamento semelhante foi observado por Beigzadeh Ghelejlou, Esmaili e Almasi (2016) e Dias *et al.* (2014). Entretanto, o nanorreforço não resultou em diferenças estatísticas na opacidade quando comparado com o controle (Tabela 5.4). As camadas da montmorilonite possuem espessuras inferiores ao comprimento de onda da luz visível, desta forma não divergem a luz, sendo transparentes (Dias *et al.*, 2014).

A transparência dos filmes foi também avaliada por meio de um varrimento da transmitância interna da luz que os filmes deixam passar ao longo de todo comprimento de onda visível e UV (Figura 5.9). A transparência dos filmes foi mais afetada pela incorporação do óleo essencial do que pela nanoargila, embora os bio-nanocompósitos se apresentem ligeiramente mais opacos quando comparados com os tratamentos sem a MMTNa. Esta maior proteção contra a luz (principalmente na zona UV) é uma vantagem desses filmes, uma vez que os processos de oxidação são catalisados pela presença de luz, especialmente em comprimentos de onda UV (Tian *et al.*, 2013). Portanto, a combinação do

OEA e da MMTNa pode resultar numa proteção extra contra o processo de deterioração devido à oxidação, e por consequência resultar em extensão da vida útil do alimento embalado (Kanatt *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2017).

Na Figura 5.9, para comprimentos de onda inferiores aos 400 nm, pode-se ver a boa barreira à luz desempenhada pelos filmes, devido às menores percentagens de luz transmitidas através dos mesmos. O efeito do conteúdo de OEA também foi observado neste parâmetro, por exemplo, para 400 nm o incremento do conteúdo do OEA originou uma diminuição da transparência entre 25 e 75% (para as menores e maiores percentagens de OEA testadas (0,5% e 2%), respetivamente). Estes resultados estão de acordo com os observados para os filmes desenvolvidos na etapa anterior deste trabalho (Capítulo 4), tendo-se observado uma tendência de diminuição da transparência com a incorporação de óleos essenciais nos filmes.

As propriedades óticas (cor, transparência / opacidade e cromaticidade) são parâmetros importantes durante o desenvolvimento de materiais destinados ao contato com alimentos, uma vez que podem interferir na aparência do produto embalado, e consequentemente na aparência e a aceitação do consumidor (Peng e Li, 2014). Em termos da aceitação dos filmes produzidos, a incorporação do nanomaterial e do OEA mudou negativamente as propriedades óticas dos filmes de quitosano, uma vez que o material passou a ter uma maior opacidade e cor amarela. Entretanto, a proteção extra conferida pela incorporação do OEA e MMTNa contra a radiação UV e o seu caráter sustentável (embalagem amiga do ambiente – biodegradável) podem equilibrar esse possível aspeto negativo, justificando a sua exploração / produção.

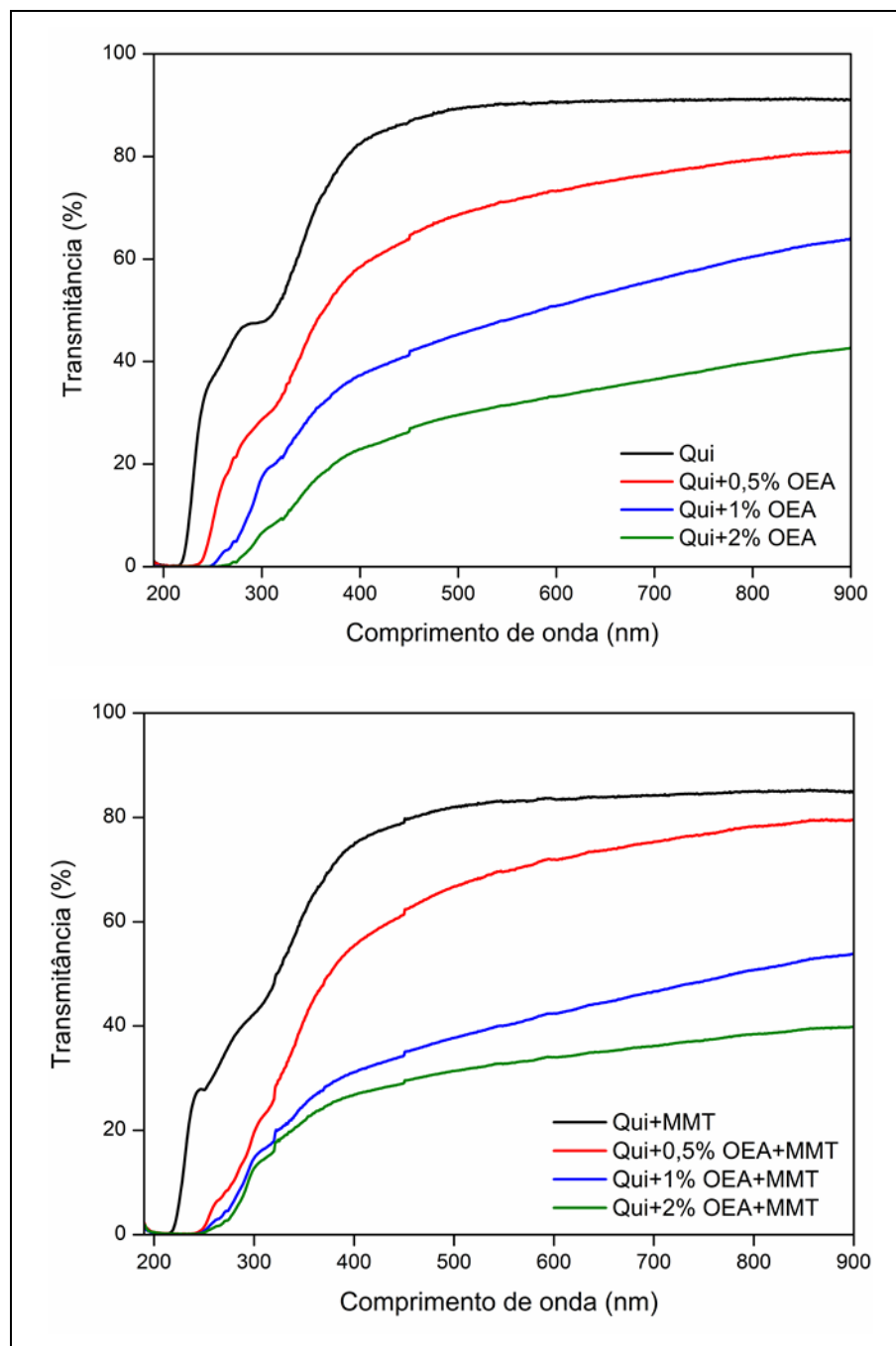


Figura 5.9. Transparência dos bionanocompósitos. Qui (quitosano); OEA (óleo essencial de alecrim); MMT (montmorilonite sódica).

5.1.6. Solubilidade em água, índice de intumescimento e ângulo de contato

O estudo da solubilidade dos filmes em água é importante pois fornece indicações de como será o comportamento do material quando em contato com alimentos com elevados teores de água ou mesmo após a sua utilização, na natureza durante o processo de biodegradação, uma vez que a maior

biodegradabilidade ou resistência do material estão diretamente relacionados com este parâmetro (Nunes *et al.*, 2013).

A solubilidade em água dos filmes de quitosano foi afetada pelos dois fatores avaliados (incorporação do OEA e MMTNa) (Tabela 5.5). Para os biopolímeros sem incorporação de OEA (0%), a adição da MMTNa reduziu a solubilidade em água do material ($p < 0,05$). Este fenómeno pode ser atribuído à estrutura lamelar da nanoargila e às interações específicas entre o quitosano e a MMTNa que estabilizam a matriz polimérica, diminuindo as possíveis interações com a água (Beigzadeh Ghelejlou *et al.*, 2016). Quando o OEA foi incorporado nos níveis 0,5% e 1%, a solubilidade não foi modificada tanto para os filmes nanorreforçados quanto para os sem adição da argila ($p > 0,05$), entretanto, para os tratamentos com maiores teores de óleo (2%) houve uma diferença significativa para este parâmetro, tendo a montmorilonite contribuído para o aumento da solubilidade destes filmes em água.

Em relação ao OEA, em geral, a solubilidade em água dos filmes aumentou com a incorporação dos compostos ativos quando estes também haviam sido incorporados com o nanomaterial ($p < 0,05$) e não variou estatisticamente nos tratamentos sem adição da MMTNa ($p > 0,05$) (Tabela 5.5). O efeito combinado da MMTNa e OEA no aumento da solubilidade em água dos filmes pode estar relacionado com a diminuição das ligações intermoleculares entre as moléculas de quitosano (por meio de pontes de hidrogénio) devido à presença dos compostos adicionados ao longo da matriz polimérica, que se ligam aos sítios reativos do polissacárido (Nunes *et al.*, 2013).

Tabela 5.5. Índice de intumescimento, solubilidade em água e ângulo de contato dos bio-nano-compósitos.

OEA (%)	Solubilidade em água (%)		Índice intumescimento (%)		Ângulo de contato (graus)	
	0% MMTNa	2,5% MMTNa	0% MMTNa	2,5% MMTNa	0% MMTNa	2,5% MMTNa
0	23,1±1,6 ^{aAB}	20,4±0,6 ^{bC}	132,3±10,0 ^{bB*}	192,2±13,3 ^{aA}	70,9±4,0 ^{bAB}	90,6±5,5 ^{aA}
0,5	22,6±0,6 ^{aAB}	23,7±0,2 ^{aB}	152,3±9,7 ^{aA}	101,1±3,4 ^{bB}	63,4±2,5 ^{bB}	84,4±4,9 ^{aA}
1,0	24,3±0,7 ^{aA}	24,4±1,1 ^{aB}	97,9±12,7 ^{aC}	34,5±4,2 ^{bC}	66,9±0,9 ^{aB}	69,1±1,7 ^{aB}
2,0	21,6±0,1 ^{bB}	26,3±0,8 ^{aA}	97,5±9,4 ^{aC}	28,1±3,0 ^{bC}	77,8±5,8 ^{aA}	58,1±3,4 ^{bB}

*(A-D): Entre cada parâmetro, médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$); (a-b): Entre cada parâmetro, médias na mesma linha seguidas por diferentes letras diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

**Montmorilonite sódica (MMT); óleo essencial de alecrim (OEA).

Apesar da diferença na solubilidade em água dos filmes controle e incorporados com 2% OEA (Qui+2%OEA) não ter sido estatisticamente significativa ($p>0,05$), os valores encontrados são ligeiramente menores para o filme com OEA, provavelmente devido às ligações cruzadas entre os compostos fenólicos presentes no OEA e o quitosano (Hafsa *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2017). Estes resultados estão de acordo com o reportado na literatura (Abdollahi *et al.*, 2012a; Beigzadeh Ghelejlou *et al.*, 2016).

A capacidade dos filmes para absorver água também foi influenciada por ambos fatores testados (Tabela 5.5). A incorporação do OEA, de um modo geral, resultou na diminuição do índice de intumescimento ($p<0,05$). Adicionalmente, a incorporação da MMTNa resultou num efeito sinérgico com uma redução ainda maior deste parâmetro.

Comparando-se os filmes de quitosano puro, sem incorporação de OEA, e o tratamento apenas reforçado com a nanoargila, observou-se um aumento do índice de intumescimento com a incorporação da MMTNa (132,3% no controle e 192,2% após incorporação da montmorilonite). Desta forma, a MMTNa teve o efeito de aumentar a capacidade do filme de quitosano para absorver água. Os íons na MMT podem atuar como agentes de ligações cruzadas na rede polimérica, aumentando a sua capacidade de absorver e reter a água (Ruiz-Hitzky *et al.*, 2013). Estes resultados são similares aos reportados por Lavorgna *et al.* (2010) que encontraram uma maior absorção de água em nanocompósitos de quitosano/nanoargilas do que em filmes de quitosano puro.

A redução da capacidade de absorção de água observada com a incorporação do OEA pode ser explicada devido à formação de redes de ligações cruzadas por pontes de hidrogénio entre os grupos amina do quitosano e os grupos hidroxilo dos compostos fenólicos presentes nos extratos ativos (Silva-Weiss *et al.*, 2013). Com a adição da MMT, devido à configuração intercalada alcançada, houve uma boa dispersão das moléculas de quitosano entre as galerias da argila, que ao formarem ligações químicas entre si, bloquearam os grupos reativos do polímero, diminuindo a capacidade do mesmo de ligar-se e interagir com a

água (Abdollahi *et al.*, 2012a; Lavorgna *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2017), consequentemente contribuindo para diminuir ainda mais o índice de intumescimento.

O ângulo de contato com a água é um bom indicador do nível de hidrofili-
dade/hidrofobicidade dos filmes. Quanto menor o ângulo de contato entre o filme
e a água maior é sua hidrofili-idade. Valores de ângulo superiores a 90° signifi-
cam que o material é hidrofóbico (Dias *et al.*, 2014; Jung e Bhushan, 2006). Os
filmes de quitosano puro (controlo) apresentaram valores médios do ângulo de
contato de $70,9^\circ \pm 4,0^\circ$ (Tabela 5.5), como era esperado por se tratar de um
material de caráter hidrofílico (Fig. 5.10). Resultados semelhantes são reporta-
dos na literatura para filmes de quitosano ou multicamadas de quitosano e Fu-
coPol que apresentaram respetivamente os valores de $58,1^\circ$ e $70,6^\circ$ (Ferreira *et al.*, 2016).

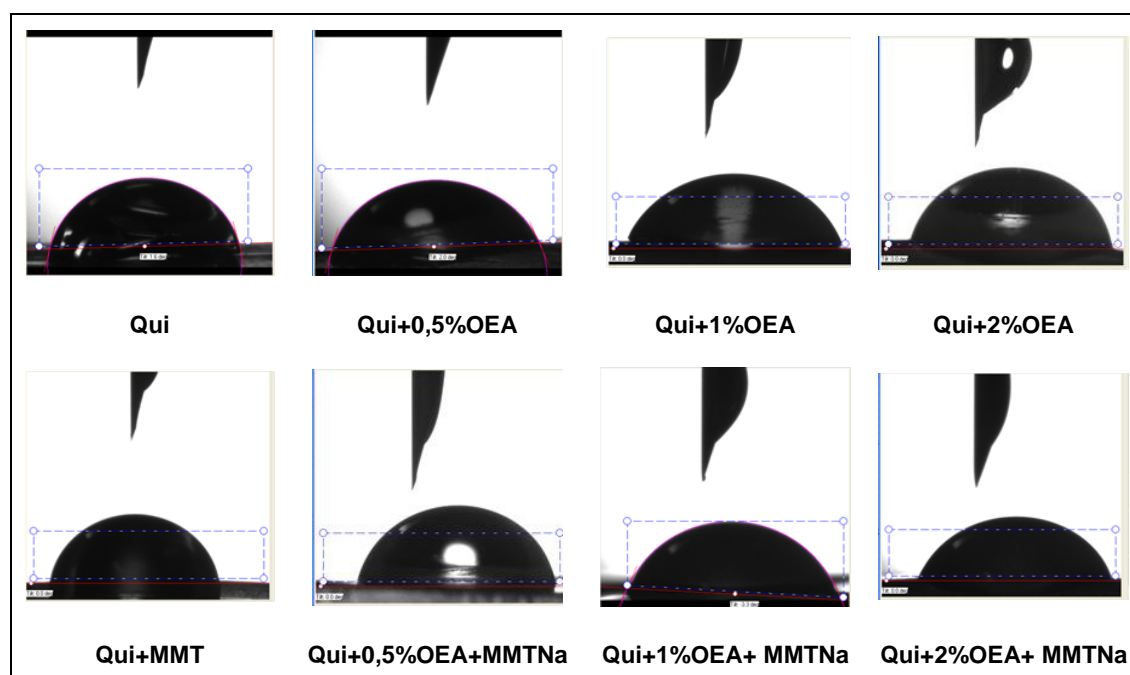


Figura 5.10. Ilustração dos ângulos de contato dos filmes com água. Qui (quitosano); OEA (óleo
essencial de alecrim); MMTNa (montmorilonite sódica)

Comparando-se os filmes controlo e incorporados apenas com a MMTNa,
a adição da nanoargila resultou em filmes menos hidrofílicos (aumento signifi-
cativo no ângulo de contato – $p < 0,05$) (Tabela 5.5). A diminuição da hidrofili-
dade superficial dos filmes com a incorporação da MMTNa pode ser explicada devido
às interações entre os grupos reativos do quitosano e da argila que esconderam

os grupos funcionais do polímero num nível interno na matriz, abaixo da superfície (Lewandowska, 2015), tornando a superfície do material mais hidrofóbica.

Nos filmes onde houve adição da MMTNa e OEA ocorreu o oposto (diminuição do ângulo de contato), ou seja, foram obtidas películas com maior hidroflicidade superficial. Este resultado pode indicar a presença de grupos hidrofílicos, como compostos fenólicos presentes nos óleos essenciais (Ribeiro-Santos *et al.*, 2015)), na superfície dos filmes produzidos (Contini *et al.*, 2011), resultando na diminuição dos valores de ângulo de contato.

5.2. Avaliação “in vitro” das propriedades ativas dos filmes

5.2.1. Atividade antimicrobiana – teste de difusão em agar

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim e dos filmes foi determinada por meio do teste de difusão em agar (Tabela 5.6). O óleo puro apresentou boa atividade antibacteriana e antifúngica contra bactérias patogénicas gram-positivas (*B. cereus*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*), bactérias gram-negativas (*S. enterica* e *E. coli*) e contra a levedura *C. albicans*.

A maior inibição do crescimento microbiano foi registada contra a levedura, tendo sido observada a inibição total do crescimento na placa quando o OEA foi testado na sua forma pura, e um halo de inibição de 42 mm quando se testou este óleo diluído em DMSO (1:1). Em relação ao poder antibacteriano, o óleo foi mais eficiente contra as bactérias gram-positivas do que contra as gram-negativas, embora tenham sido registados halos de inibição contra *S. enterica* e *E. coli* com $11,3 \pm 1,2$ e $12,7 \pm 2,5$ mm de diâmetro, respetivamente.

O bom poder antimicrobiano do óleo essencial de alecrim está relacionado, com a existência na sua composição de compostos como o 1,8-cineol, canfeno, eugenol, α -pineno, ácido rosmarínico e carnosídico (Abdollahi *et al.*, 2012b; Ribeiro-Santos *et al.*, 2015). Geralmente, os componentes ativos dos óleos essenciais inibem o crescimento dos microrganismos por indução de danos na parede celular ou na membrana citoplasmática que levam a alterações da permeabilidade das células e perda do conteúdo celular, perturbação da força

protomotriz, perturbação do transporte ativo, inibição da síntese proteica ou redução do ATP intracelular (Fig.5.11).

A diferença na sensibilidade ao OEA entre as bactérias gram-positivas e gram-negativas está relacionada com as diferenças na estrutura das paredes celulares destes dois grupos de bactérias. A maior resistência por parte das bactérias gram-negativas ao óleo essencial pode ser atribuída à complexidade da dupla camada da sua parede celular, em comparação com a camada única da parede das bactérias gram-positivas. Devido à sua hidrofobicidade, os óleos essenciais apresentam afinidade para com os lípidos encontrados nas membranas celulares das bactérias o que facilita a sua penetração nas células microbianas com o respetivo comprometimento da sua estrutura e funcionalidade (Burt, 2004; Nazzaro, Fratianni, De Martino, Coppola, & De Feo, 2013). Por este motivo, as bactérias gram-negativas são mais resistentes aos óleos essenciais do que as bactérias gram-positivas, devido ao papel protetor dos lipopolissacáridos da membrana externa da parede celular contra a difusão de compostos hidrofóbicos (Abdollahi *et al.*, 2012b; Nazzaro *et al.*, 2013; Nouri *et al.*, 2017).

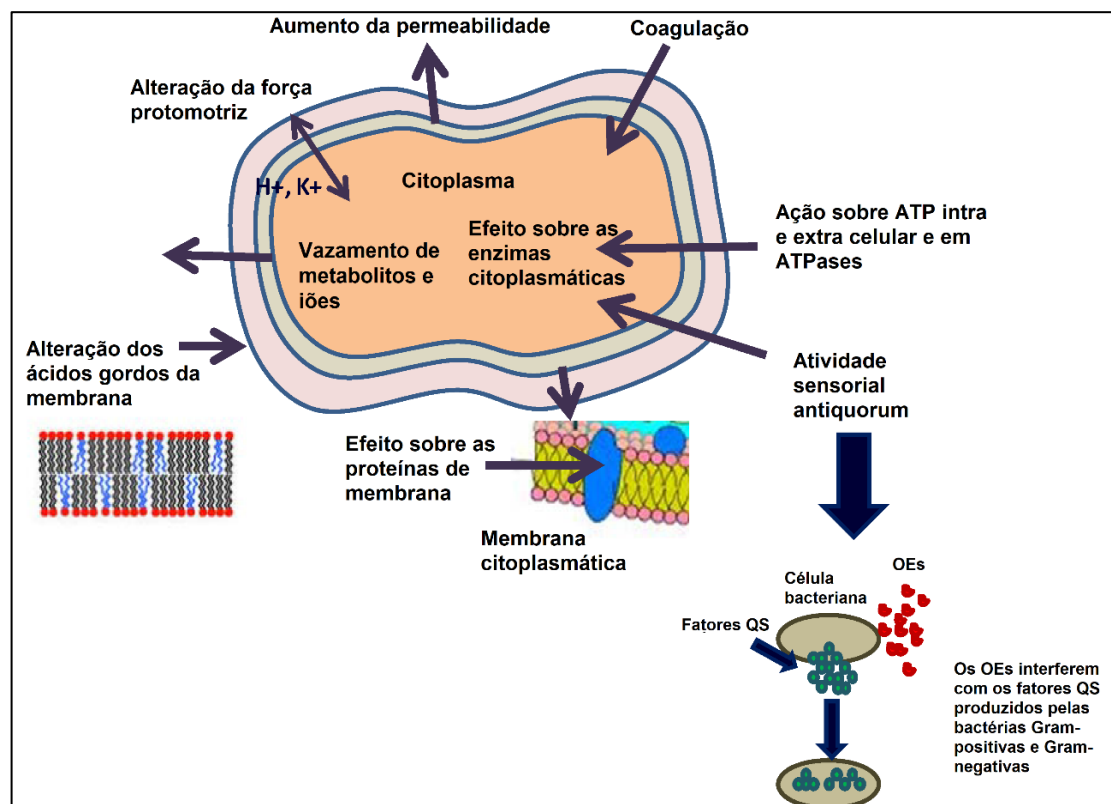


Figura 5.11. Esquema dos possíveis mecanismos de ação dos óleos essenciais nas membranas microbianas. Adaptado de (Nazzaro, Fratianni, De Martino, Coppola, e De Feo, 2013).

Tabela 5.6. Atividade antimicrobiana “in vitro” do óleo essencial de alecrim e dos filmes ativos.

Teste de difusão em agar	Amostra	Bactérias gram-positiva				Bactérias gram-negativa			Levedura
		<i>B. cereus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
	DMSO	0	0	0	0	0	0	0	0
	OEA 50%	-	-	-	-	-	-	-	42 ± 0
	OEA 100%	21,7 ± 0,6	0	14,0 ± 2,0	22,0 ± 2,0	11,3 ± 1,2	12,7 ± 2,5	0	Inibição total
	Papel filtro	0	0	0	0	0	0	0	0
	PVC	0	0	0	0	0	0	0	0
	QUI	0	0	0	0	0	0	0	0
	QUI + MMTNa	0	0	0	0	0	0	0	0
	QUI + 0,5%OEA	6	0	6	6	6	6	0	0
	QUI+0,5%OEA+MMTNa	6	0	6	6	6	6	0	0
	QUI + 1%OEA	6	0	6	6	6	6	0	6
	QUI+1%OEA+ MMTNa	6	0	6	6	6	6	0	6
	QUI + 2%OEA	6	0	6	6	6	6	0	6
	QUI+2%OEA+MMTNa	6	0	6	6	6	6	0	6
Método de contagem células viáveis	Amostra	Bactérias gram-positiva (<i>B. cereus</i>)			Bactéria gram-negativa (<i>S. enterica</i>)				
		UFC/mL	Log (UFC/mL)	Atividade antibacteriana (reduções logarítmicas)	UFC/mL	Log (UFC/mL)	Atividade antibacteriana (reduções logarítmicas)		
	Controlo	1,8 X 10 ⁸	8,3	-	6,3 X 10 ⁸	8,8	-		
	QUI	10	1	7,3 ± 0,1 A**	5,3 X 10 ³	3,7	5,3 ± 0,6 ^A		
	QUI + MMTNa	1,6 X 10 ²	2,2	6,7 ± 1,0 ^A	4,2 X 10 ⁵	5,6	3,6 ± 0,7 ^B		
	QUI + 0,5%OEA	10	1	7,3 ± 0,1 ^A	9,0 X 10 ³	4,0	5,1 ± 0,9 ^A		
	QUI+0,5%OEA+MMTNa	5,3 X 10 ⁴	4,7	4,0 ± 0,8 ^{AB}	1,1 X 10 ⁵	5,0	3,9 ± 0,4 ^{AB}		
	QUI + 1%OEA	1,3 X 10 ³	3,1	6,4 ± 1,6 ^{AB}	3,0 X 10 ³	3,5	5,3 ± 0,1 ^A		
	QUI+1%OEA+MMTNa	1,7 X 10 ⁵	5,2	3,1 ± 0,4 ^B	3,3 X 10 ⁴	4,5	4,3 ± 0,1 ^{AB}		
	QUI + 2%OEA	1,6 X 10 ⁵	5,2	4,5 ± 1,4 ^{AB}	1,1 X 10 ⁷	7,1	3,0 ± 1,4 ^B		
	QUI+2%OEA+MMTNa	1,0 X 10 ⁴	4,0	6,1 ± 2,0 ^{AB}	3,6 X 10 ⁴	4,6	4,3 ± 0,2 ^{AB}		

* Zona de inibição (halo) igual a 6 mm significa que não houve crescimento microbiano sob o disco do filme.

** (A-B): Para cada teste, médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

DMSO: Dimetil sulfóxido; OEA: Óleo essencial de alecrim; Qui: Quitosano; MMTNa: Montmorilonite sódica.

Em relação aos filmes, apenas os que foram incorporados com OEA apresentaram atividade antimicrobiana relativamente a bactérias gram-positivas ou negativas. A inibição do crescimento ocorreu apenas sob os discos dos filmes (6 mm de diâmetro), não tendo sido observados halos de inibição em torno dos discos (Tabela 5.6). A atividade antifúngica foi menos evidente após a produção dos filmes, apenas os que foram incorporados com 1% ou 2% de OEA apresentaram inibição do crescimento fúngico sob os discos do filme. Os filmes controle, sem incorporação de OEA, não apresentaram atividade no teste de difusão em agar contra nenhum dos microrganismos testados.

Discos estéreis de papel filtro, assim como películas aderentes comerciais (PVC) foram utilizadas como controlos negativos, validando o teste realizado uma vez que houve crescimento dos microrganismos tanto debaixo do papel filtro como do PVC, demonstrando que a inibição do crescimento observado com os filmes de quitosano incorporados com OEA foi devida aos mesmos e não a uma possível condição de anaerobiose criada pelo contato dos discos com a superfície do agar. Estes resultados estão em boa concordância com os observados em filmes de quitosano incorporados com OEA (Abdollahi *et al.*, 2012b) ou extrato de própolis (Siripatrawan e Vitchayakitti, 2016).

A diminuição da atividade antimicrobiana do OEA após incorporação na matriz polimérica pode ser explicada devido às pequenas quantidades presentes nos filmes, ou à boa interação dos compostos do óleo com o quitosano que dificultou a migração dos compostos ativos para o agar (Altiok, Altiok, e Tihminlioglu, 2010, Vieira *et al.*, 2018) diminuindo o contato entre as células bacterianas e os compostos com atividade antimicrobiana (Siripatrawan e Vitchayakitti, 2016).

5.2.2. Atividade antimicrobiana – contagem de células viáveis

A atividade antimicrobiana dos filmes contra duas bactérias patogénicas, veiculadas por alimentos, uma gram-positiva (*B. cereus*) e uma gram-negativa (*S. enterica*) foi também estudada de forma quantitativa pelo método de contagem de células viáveis. Os filmes obtiveram ótimos resultados neste teste,

independente da incorporação do OEA ou MMTNa, para ambas as bactérias testadas, mas com maior poder antimicrobiano contra a bactéria gram-positiva (Tabela 5.6), em linha com os resultados obtidos no teste de difusão em agar anteriormente discutido.

Os filmes controlo, sem incorporação de qualquer composto, apresentaram uma redução logarítmica na contagem de células viáveis de aproximadamente 7,3 ou 5,3 log após 24 h de incubação para o *B. cereus* e *S. enterica*, respetivamente. De um modo geral, a incorporação da nanoargila reduziu a atividade antimicrobiana dos filmes, o que corrobora os resultados obtidos no ensaio de migração que será discutido a seguir. A incorporação do OEA não resultou em diferenças significativas na atividade antimicrobiana ($p>0,05$) exceto para o filme incorporado com 1% de OEA + MMTNa contra *B. cereus* e 2% de OEA contra *S. enterica*.

O mecanismo de ação antimicrobiano do quitosano está relacionado com a sua capacidade de danificar / alterar a parede e as membranas celulares de fungos e bactérias por meio de interações eletrostáticas, que levam à permeabilização das mesmas com vazamento de material intracelular, resultando na morte celular (Verlee, Mincke, e Stevens, 2017). Nas bactérias gram-positivas, o quitosano liga-se de forma não covalente com os ácidos teicóicos da camada de peptidoglicano, enquanto que nas bactérias gram-negativas ele atua como quelante de importantes nutrientes e componentes da célula (catiões) ou descontinuando a integridade celular por meio de interações eletrostáticas com componentes carregados negativamente dos lipopolissacáridos da membrana externa (Nouri *et al.*, 2017; Verlee *et al.*, 2017).

A redução da atividade antimicrobiana dos filmes com a incorporação da nanoargila está provavelmente relacionada com a boa interação obtida entre a MMTNa e o polímero (como previamente discutido nos ensaios de FT-IR e DRX) que reduziu o número de grupos funcionais (grupos amida) do quitosano para atuar na membrana dos microrganismos e causar os danos, e a morte celular, no entanto este comportamento nunca foi reportado na literatura.

Este estudo da atividade antimicrobiana dos filmes demonstra que os filmes produzidos têm potencial para serem utilizados como novos materiais / tecnologia no controlo de microrganismos veiculados por alimentos (patogénicos ou não) protegendo os alimentos ao mesmo tempo que mantêm a sua qualidade e inocuidade.

5.2.3. Migração de compostos fenólicos totais

O perfil de migração dos compostos fenólicos totais estabelecido foi de “crescimento exponencial até um máximo/equilíbrio”, atingido após 48 a 72 h do início do ensaio. O teor de CFT difundidos foi proporcional à quantidade de OEA incorporado nas embalagens. A incorporação do MMTNa resultou numa redução do processo de difusão dos polifenóis para o meio simulador. Os valores dos coeficientes de difusão calculados, assim como a razão máxima libertada dos CFT são apresentados na Tabela 5.7.

O maior coeficiente de difusão registado foi nos filmes de quitosano incorporados com 2% de OEA ($20,3 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$) seguido pelos filmes com 1% do óleo ($4,0 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$), enquanto que os menores valores foram obtidos para os filmes com incorporação de MMTNa e com 0,5% ou 1% de OEA ($1,87 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ e $0,83 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$, respetivamente) (Tabela 5.7).

Tabela 5.7. Ensaio de migração - coeficientes de difusão e teores máximos migrados.

Filmes	Coeficiente de difusão ($10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$)	Máximo de compostos fenólicos difundidos / total incorporado nos filmes	Máxima % sequestro radical (DPPH)
Qui**	-	-	-
Qui+MMTNa	-	-	-
Qui+0.5% OEA	$1,32 \pm 0,49^{\text{B}}$	0,19	2,8
Qui+MMTNa+0.5% OEA	$1,87 \pm 0,74^{\text{B}}$	0,16	2,6
Ch+1% OEA	$4,00 \pm 1,18^{\text{B}}$	0,26	3,6
Qui+MMTNa+1% OEA	$0,83 \pm 0,16^{\text{B}}$	0,18	3,0
Qui+2% OEA	$20,3 \pm 5,1^{\text{A}}$	0,54	4,4
Qui+MMTNa+2% OEA	$1,81 \pm 1,10^{\text{B}}$	0,19	5,3

* (A-B): médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$). ** OEA: Óleo essencial de alecrim; Qui: Quitosano; MMTNa: Montmorilonite sódica.

O comportamento estabelecido para migração dos compostos fenólicos foi similar ao anteriormente reportado na literatura (Ramos, Jiménez, *et al.*, 2014; Souza, Rodrigues, *et al.*, 2018). De acordo com Abdollahi *et. al* (2012), que também estudou filmes de quitosano incorporados com óleo essencial de alecrim, devido à interação entre os grupos funcionais dos extratos ativos com os

grupos hidroxilo e amida do quitosano ocorre um arranjo particular da matriz polimérica. Ainda segundo estes autores, nos bio-nanocompósitos (filmes de quitosano + MMTNa) onde também é adicionado OEA, as interações por pontes de hidrogénio entre o polímero e o MMT são favorecidas/aumentadas. Esta boa interação entre os componentes do filme, podem explicar o comportamento observado no processo de difusão dos CFT nos filmes incorporados com a nanoargila. A rede formada entre a MMT e o quitosano aprisionou os compostos fenólicos presentes no OEA, limitando sua difusão para o simulador alimentar utilizado. Este comportamento é facilmente observado analisando-se os teores máximos de compostos fenólicos migrados, para os filmes sem incorporação de MMT estes valores variaram entre 0,19-0,54, enquanto que para os filmes reforçados com a nanoargila apenas entre 0,16-0,19 (Tabela 5.7).

A atividade antioxidante do meio simulador após o contato com os filmes também foi medida pelo método de sequestro do radical DPPH. Independentemente da incorporação ou não da MMTNa, os compostos fenólicos presentes nos simuladores apresentaram percentagens máximas entre 2,6-5,3% de sequestro do radical DPPH para os filmes incorporados com OEA nas concentrações avaliadas (Tabela 5.7). A pequena atividade antioxidante pode estar relacionada com a baixa concentração de CFT nos simuladores (baixas concentrações de OEA incorporados nos filmes que foram utilizados em pequenos pedaços no ensaio), entretanto demonstra que houve a manutenção da atividade antioxidante dos OEA mesmo após a etapa de produção dos filmes e exposição às condições do ensaio de migração.

5.3. Avaliação “in situ” dos filmes – estudo da vida de prateleira de carne fresca de frango

5.3.1. Caracterização físico-química

A vida de prateleira de carne fresca de frango embalada nos filmes ativos de quitosano foi avaliada por meio da medição de alguns parâmetros físico-químicos (pH, acidez, humidade e cor) ao longo de 15 dias de armazenamento (Tabela 5.8).

Tabela 5.8. Estudo da vida de prateleira de carne fresca de frango – parâmetros físico-químicos.

Parâmetros**	Dias	Sem filme	PVC	Qui	Qui+ 0,5%OEA	Qui+ 1%OEA	Qui+ 2%OEA	Qui+ MMTNa	Qui+MMTNa+ 0,5%OEA	Qui+MMTNa+ 1%OEA	Qui+MMTNa+ 2%OEA
hue* (graus)	0	55±4 ^{Ba*}	55±1 ^{Ca}	53±4 ^{Aa}	52±0 ^{Ba}	52±0 ^{Da}	52±0 ^{Ca}	52±1 ^{ABa}	52±1 ^{Ba}	52±1 ^{Ba}	52±1 ^{Ba}
	3	58±3 ^{Bab}	58±1 ^{Bab}	55±2 ^{Abc}	57±1 ^{Aa}	60±1 ^{Aa}	60±1 ^{Aa}	52±0 ^{ABc}	50±0 ^{Bc}	61±0 ^{Aa}	52±0 ^{Bc}
	7	61±4 ^{ABab}	64±0 ^{Aa}	53±1 ^{Acde}	55±1 ^{Abcde}	58±1 ^{Bbcd}	59±0 ^{Aabc}	49±1 ^{Be}	52±0 ^{ABde}	57±6 ^{Abcd}	57±2 ^{Abcd}
	10	64±5 ^{ABa}	63±1 ^{Aab}	49±5 ^{Ad}	56±1 ^{Abcd}	56±0 ^{BCbcd}	57±1 ^{Bbc}	55±2 ^{Ac}	54±1 ^{Ac}	59±2 ^{Aabc}	59±1 ^{Aabc}
	15	71±1 ^{Aa}	64±1 ^{Ab}	53±2 ^{Ac}	55±2 ^{ABcd}	55±1 ^{Ccd}	55±1 ^{Bcd}	54±2 ^{Ac}	53±1 ^{ABd}	58±2 ^{Ac}	57±1 ^{Ac}
pH	0	5,70±0,04 ^{Ca}	5,96±0,15 ^{Ca}	5,96±0,3 ^{Ba}	5,96±0,3 ^{Aa}	5,96±0,3 ^{ABa}	5,96±0,3 ^{Aa}	5,70±0,04 ^{Aa}	5,70±0,04 ^{Aa}	5,70±0,0 ^{Aa}	5,70±0,04 ^{Ba}
	3	5,72±0,06 ^{Ccde}	6,19±0,08 ^{Ca}	6,01±0,2 ^{Bab}	5,71±0,2 ^{Acde}	5,54±0,1 ^{Ce}	5,56±0,1 ^{Ade}	5,86±0 ^{Abc}	5,84±0,0 ^{Abcd}	5,69±0,1 ^{Acde}	5,80±0 ^{Bbcde}
	7	6,97±0,2 ^{Ba}	6,50±0,12 ^{Bab}	6,33±0 ^{Bbcd}	6,16±0,2 ^{Abcd}	6,09±0 ^{Abcde}	5,80±0,0 ^{Ade}	6,41±0,6 ^{Aabc}	5,81±0,1 ^{Ade}	5,91±0,2 ^{Acde}	5,58±0,0 ^{Bde}
	10	7,99±0,1 ^{Aa}	6,79±0,04 ^{Bb}	6,51±0,2 ^{Bbc}	6,08±0,1 ^{Abc}	5,68±0,1 ^{BCc}	5,80±0,2 ^{Ac}	6,35±0,5 ^{Abc}	6,21±0,4 ^{Abc}	6,28±0,4 ^{Abc}	6,37±0,6 ^{Abc}
	15	8,01±0,39 ^{Aa}	7,26±0,13 ^{Ab}	7,14±0,2 ^{Abc}	6,29±0,2 ^{Ad}	6,17±0,1 ^{Ad}	6,00±0,2 ^{Ad}	6,44±0,3 ^{Ac}	6,27±0,3 ^{Ad}	6,06±0,3 ^{Ad}	6,06±0,3 ^{Bd}
Acidez titulável (g/100g de ácido oleico)	0	2,19±0,01 ^{Aa}	1,68±0,22 ^{Ab}	1,94±0,08 ^{Aa}	1,94±0,08 ^{Aa}	1,94±0,08 ^{Aa}	1,94±0,08 ^{Aa}	2,19±0,01 ^{Aa}	2,19±0,01 ^{Aa}	2,19±0,01 ^{Aa}	2,19±0,01 ^{Aa}
	3	2,11±0,03 ^{Aab}	1,32±0,08 ^{Bc}	1,13±0,01 ^{Bc}	1,30±0,24 ^{ABc}	1,15±0,09 ^{Cc}	1,25±0,04 ^{Cc}	2,30±0,58 ^{Aa}	1,39±0,13 ^{Cc}	1,64±0,32 ^{Babc}	1,53±0,09 ^{Bbc}
	7	0,80±0,16 ^{Cd}	1,27±0,07 ^{Bbc}	0,85±0,05 ^{Bd}	0,87±0,08 ^{Bd}	1,14±0,08 ^{Cc}	1,04±0,02 ^{Dcd}	1,41±0,15 ^{BCb}	1,80±0,02 ^{Ba}	1,14±0,06 ^{Cc}	1,20±0,04 ^{Cbc}
	10	1,09±0,05 ^{Bc}	1,15±0,06 ^{BCc}	1,13±0,18 ^{Bc}	1,32±0,19 ^{ABbc}	1,32±0,03 ^{BCbc}	1,23±0,03 ^{Cc}	1,74±0,07 ^{ABa}	1,77±0,12 ^{Ba}	1,82±0,01 ^{ABa}	1,57±0,04 ^{Bab}
	15	0,77±0,04 ^{Cc}	0,87±0,02 ^{Cc}	1,22±0,29 ^{Babc}	1,14±0,43 ^{Babc}	1,50±0,02 ^{Bab}	1,59±0,13 ^{Ba}	0,97±0,03 ^{Cc}	1,02±0,05 ^{Dbc}	1,06±0,03 ^{Cbc}	1,14±0,06 ^{Cabc}
Humidade (%)	0	75,4±0,4 ^{Ba}	75,5±0,2 ^{Ba}	74,9±0,6 ^{Aa}	74,9±0,6 ^{Aa}	74,9±0,6 ^{Aa}	74,9±0,6 ^{Aa}	75,3±0,5 ^{Aa}	75,0±0,3 ^{Aa}	75,0±0,3 ^{Aa}	75,0±0,3 ^{Aa}
	3	75,1±0,1 ^{Bab}	75,8±0,4 ^{Ba}	73,4±0,1 ^{BCabcd}	73,1±1,1 ^{Abcd}	71,8±0,4 ^{Cd}	72,3±0,6 ^{Ad}	73,4±0,2 ^{Aabcd}	74,9±2,3 ^{Aabc}	71,4±0,5 ^{Bd}	72,4±0,4 ^{Bcd}
	7	75,9±0,1 ^{ABa}	75,1±0,4 ^{Bab}	72,5±0,1 ^{Ccd}	73,6±0,5 ^{Abc}	72,0±0,5 ^{BCde}	72,0±0,5 ^{Ade}	72,9±0,8 ^{Ac}	72,0±0,6A ^{Bde}	70,7±0,7B ^{Ce}	72,3±0,5 ^{Bcd}
	10	76,7±0,1 ^{Aa}	75,6±0,3 ^{Bab}	74,5±0,3 ^{ABab}	74,4±1,3 ^{Aab}	73,5±1,3 ^{ABCabc}	72,9±2,3 ^{Abcd}	72,9±2,6 ^{Abcd}	69,5±0,3 ^{Bde}	69,1±1,1 ^{Ce}	70,6±0,1 ^{Cce}
	15	76,6±0,9 ^{Aa}	76,7±0,1 ^{Aa}	73,4±0,8 ^{Bb}	73,6±0,5 ^{Ab}	73,7±0,1 ^{ABb}	73,4±1,0 ^{Ab}	73,0±1,1 ^{Ab}	73,7±0,6 ^{Ab}	72,1±0,2 ^{Bbc}	70,8±0,5 ^{Cc}

*(A-D): Para cada parâmetro, médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$); (a-f): Para cada parâmetro, médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).

** OEA: Óleo essencial de alecrim; Qui: Quitosano; MMTNa: Montmorilonite sódica.

O elevado teor de lípidos insaturados (mais suscetíveis aos processos oxidativos) e as características intrínsecas de pH, humidade e teor proteico ótimas para o desenvolvimento de bactérias aeróbicas deterioradoras (por exemplo *Pseudomonas spp.*, *Enterobacteriaceae* ou bactérias lácticas) tornam a carne de frango um alimento altamente perecível (Silva, Domingues, e Nerín, 2018)

Ao longo do tempo, foi observada uma tendência de aumento dos valores de pH, humidade e ângulo de hue (hue*) com uma diminuição da acidez titulável nas carnes de frango estudadas (Tabela 5.8). As mudanças foram mais intensas nas carnes que não receberam qualquer proteção (carnes sem filme) seguido pelas carnes revestidas pelo PVC.

Do ponto de vista colorimétrico, o valor inicial de hue* das carnes foi de cerca de 52°, ou seja, uma tonalidade avermelhada. Após os 15 dias de armazenamento sob refrigeração, o ângulo de hue registado para as carnes sem filme foi de 71°, enquanto que para o alimento protegido pela película comercial de 64°. O aumento dos valores de hue* representa uma mudança na cor do produto em direção matiz amarela/verde, o que representa no caso das carnes um processo de descoloração. Em relação aos produtos protegidos pelos filmes ativos de quitosano desenvolvidos, houve uma manutenção da coloração inicial das carnes, não tendo sido observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores de hue* encontrados no início e no fim da experiência (entre 52° e 57° no 15º dia de avaliação).

A oxidação lipídica em conjunto com a degradação dos grupos hemo e formação da meta-mioglobina são descritos como os responsáveis pelo processo de descoloração de carnes armazenadas sob refrigeração (Ghaderi-Ghahfarokhi, Barzegar, Sahari, Ahmadi Gavlighi, e Gardini, 2017; Melo *et al.*, 2012). Desta forma, os filmes de quitosano provavelmente evitaram / retardaram os processos deterioradores, uma vez que mantiveram a cor do produto ao longo do tempo de prateleira avaliado.

Uma vez que a cor é um atributo sensorial de extrema importância na decisão de compra de um produto, sendo que, produtos cárneos escuros ou descolorados são rejeitados pelos consumidores (Rojas e Brewer, 2008), estes

resultados são promissores e demonstram o potencial destas embalagens na conservação da qualidade de carne fresca de frango, com possível extensão da vida útil do produto embalado.

Em relação ao pH, apenas as amostras sem filme, ou envoltas no PVC ou nos filmes controlo (quitosano sem incorporação de OEA ou MMTNa) apresentaram aumento nos valores de pH no final dos 15 dias de armazenamento ($p < 0,05$). O pH de todas as outras amostras no final do 15º dia de armazenamento não variou estatisticamente desde o início das experiências ($p > 0,05$), apesar de numericamente serem ligeiramente superiores do que no tempo zero.

Comparando-se os valores de pH entre as diferentes amostras, no último dia de análise, verifica-se que a carne sem filme apresentou valores de pH significativamente superiores a todas as demais amostras ($p < 0,05$). Já os produtos protegidos pelos filmes controlo, Qui + MMTNa ou PVC não diferiram entre si ($p > 0,05$), apesar de apresentarem valores de pH superiores ao das carnes protegidas nos filmes incorporados com OEA ($p < 0,05$). Estes últimos por sua vez, não apresentaram diferenças nos valores de pH entre si ($p > 0,05$).

O comportamento obtido é similar ao reportado na literatura para carnes de frango (Melo *et al.*, 2012) ou peixe (Abdollahi *et al.*, 2014) embalados respetivamente em filmes de acetato de celulose ou quitosano incorporados com OEA. De forma análoga, os valores encontrados para a acidez titulável seguiram o comportamento inverso, ou seja, com o aumento do pH houve uma diminuição da acidez, corroborando os resultados de pH.

Para alimentos ricos em proteínas e aminoácidos livres que são acondicionados sob condições de aerobiose, o incremento nos valores de pH geralmente é atribuído à produção de compostos básicos voláteis associada ao desenvolvimento de microrganismos, isto é, a atividade proteolítica dos microrganismos resulta na produção de aminas voláteis (Abdollahi *et al.*, 2014; Melo *et al.*, 2012). Desta forma, o efeito protetor dos filmes provavelmente está relacionado com o seu poder de retardar o crescimento microbiano como será discutido posteriormente.

Em geral, a humidade das carnes protegidas pelos filmes ativos diminuiu ao longo do tempo de armazenamento ($p < 0,05$) (Tabela 5.8). O quitosano é um polissacárido hidrofílico cujos filmes são capazes de absorver grandes quantidades de água (Souza *et al.*, 2017), o que pode explicar a redução do conteúdo em água das amostras embaladas nestes tratamentos. Hambúrgueres pré-cozidos de carne bovina acondicionados sob refrigeração sem proteção também apresentaram valores mais elevados de humidade quando comparados com o produto protegido por filmes de quitosano (Wu *et al.*, 2000). Segundo estes autores, os menores valores de humidade encontrados nas carnes protegidas pelos filmes de quitosano foi atribuído a capacidade de absorção de água dos filmes de quitosano, corroborando os resultados aqui expostos.

5.3.2. Determinação das TBARS

Os valores iniciais de TBARS encontrados situaram-se aproximadamente a 0,15 mg de MDA/kg de carne, tendo sido registado um aumento ao longo do tempo (Tabela 5.9). As amostras de carne sem filme atingiram um valor médio de 2,03 mg MDA/kg de carne ao final dos 15 dias de ensaio, enquanto que as amostras protegidas pelos filmes de quitosano mantiveram os níveis de MDA muito inferiores ($p < 0,05$), próximos dos valores iniciais (tempo zero).

As amostras protegidas pelos filmes de quitosano incorporados com OEA mas sem o nanorreforço mantiveram os valores de MDA iguais até o 15º dia de armazenamento ($p > 0,05$), ou seja, foram capazes de impedir que a oxidação dos lípidos na carne acontecesse. Para as amostras acondicionadas nos filmes de quitosano incorporados simultaneamente com OEA e MMTNa, os teores de MDA encontrados foram inferiores aos registados para a carne não embalada, mas superiores ao valor no início da experiência ($p < 0,05$).

O atraso no processo oxidativo das carnes pode ser atribuído a alguns fatores, nomeadamente: (i) às boas propriedades de barreira ao oxigénio dos filmes retardando o processo de iniciação da oxidação lipídica; (ii) a capacidade do quitosano de captar catiões (Abdollahi *et al.*, 2014), que são catalisadores das reações oxidativas; e (iii) aos compostos antioxidantes presentes no OEA incorporados nos filmes que ao transferir átomos de hidrogénio ou eletrões,

estabilizam os radicais livres interrompendo a reação oxidativa em cadeia (Melo *et al.*, 2012). Resultados similares foram reportados para diferentes biopolímeros incorporados com óleos essenciais e aplicados em diferentes produtos, nomeadamente: filmes de quitosano incorporado com OEA aplicado em filetes de peixe fresco (Abdollahi *et al.*, 2014); filmes de acetato de celulose incorporado com OEA como embalagem de peito de frango (Melo *et al.*, 2012); filmes de quitosano incorporado com óleo essencial de tomilho também aplicado a peixe (Yang *et al.*, 2015).

A oxidação lipídica é uma das principais causas da deterioração de alimentos, sendo responsável pela modificação de importantes atributos sensoriais (i.e. desenvolvimento de odores, ranço, e descoloração da carne) que são na maioria dos casos associados a rejeição ou perda de valor do produto por parte dos consumidores (Kaewprachu, Osako, Benjakul, e Rawdkuen, 2015; Vilarinho *et al.*, 2018).

Segundo Sheard *et. al* (2000), o limiar de detecção de “off-flavor/off-odour” (mau cheiro) por consumidores corresponde a um valor de TBARS equivalente a 0,5 mg de MDA/kg de carne. Comparando-se os valores obtidos com este limite, é possível concluir que a carne sem filme já havia ultrapassado esses valores no sétimo dia de armazenamento, enquanto que as amostras protegidas pela película comercial, pelos filmes de quitosano + MMTNa e quitosano + MMTNa + 0,5% ou 2% OEA atingiram esse valor apenas no décimo dia de análise. Finalmente, no último dia analisado (15º dia de armazenamento), apenas as carnes embaladas no filme de quitosano + MMTNa + 1% OEA ultrapassaram o limite de rejeição, enquanto que para todas as demais amostras protegidas pelos filmes de quitosano sem incorporação do MMTNa, incorporadas ou não com OEA permaneceram abaixo do limite de aceitação sensorial do produto estabelecido por Seard *et. al* (2000). Ou seja, um potencial aumento na vida de prateleira de pelo menos 8 dias em comparação com a carne sem filme.

Tabela 5.9. Estudo da vida de prateleira de carne fresca de frango – qualidade microbiológica e oxidação lipídica.

Parâmetros**	Dia	Sem filme*	PVC	Qui	Qui+ 0,5%OEA	Qui+ 1%OEA	Qui+ 2%OEA	Qui+ MMTNa	Qui+MMTNa+ 0,5%OEA	Qui+MMTNa+ 1%OEA	Qui+MMTNa+ 2%OEA
TBARS (mg MDA/ kg carne)	0	0,15±0,01 ^{Ca}	0,15±0,01 ^{Ba}	0,14±0,01 ^{Ba}	0,14±0,0 ^{BCa}	0,14±0,01 ^{Ba}	0,16±0,03 ^{ABa}	0,15±0,02 ^{Ba}	0,15±0,01 ^{Ca}	0,15±0,01 ^{Ca}	0,15±0,01 ^{Ba}
	3	0,16±0,01 ^{Cb}	0,14±0,02 ^{Bb}	0,18±0,02 ^{Bb}	0,34±0,01 ^{Aa}	0,22±0,03 ^{Aa}	0,21±0,02 ^{Aab}	0,23±0,14 ^{BCab}	0,16±0,0 ^{Cb}	0,16±0,0 ^{Cb}	0,13±0,01 ^{Bb}
	7	0,94±0,20 ^{Ba}	0,10±0,01 ^{Bc}	0,26±0,02 ^{Abc}	0,34±0,02 ^{Abc}	0,15±0,00 ^{Bc}	0,28±0,01 ^{Abc}	0,43±0,2 ^{ABCb}	0,14±0,02 ^{Cc}	0,30±0,07 ^{Bbc}	0,15±0,01 ^{Bc}
	10	1,54±0,33 ^{Aa}	0,64±0,24 ^{Abc}	0,16±0,01 ^{Bcd}	0,22±0,01 ^{Bcd}	0,14±0,03 ^{Bcd}	0,20±0,05 ^{Bcd}	0,96±0,28 ^{ABb}	0,60±0,02 ^{Abcd}	0,21±0,03 ^{BCcd}	0,53±0,1 ^{Abcd}
	15	2,03±0,28 ^{Aa}	0,55±0,10 ^{Ac}	0,26±0,01 ^{Ac}	0,24±0,0 ^{Bc}	0,21±0,01 ^{Ac}	0,28±0,11 ^{Ac}	1,15±0,54 ^{Ab}	0,43±0,02 ^{Bc}	0,70±0,03 ^{Abc}	0,62±0,03 ^{Abc}
MTV (Log UFC/g carne)	0	5,2±0,3 ^{Da}	5,2±0,3 ^{Ca}	5,2±0,3 ^{Ca}	5,2±0,3 ^{Ca}	5,2±0,3 ^{Ca}	5,2±0,3 ^{Ca}	5,2±0,3 ^{Ca}	5,2±0,3 ^{Ba}	5,2±0,3 ^{Ca}	5,2±0,3 ^{Ca}
	3	8,5±0,5 ^{Cab}	8,7±0,0 ^{Ba}	6,4±0,3 ^{Bef}	6,3±0,0 ^{Bf}	5,7±0,1 ^{Bfg}	6,0±0,0 ^{Bf}	7,0±0,5 ^{Bde}	5,1±0,1 ^{Bg}	7,7±0,0 ^{Bcd}	7,8±0,1 ^{Bbc}
	7	9,9±0,4 ^{Ba}	9,5±0,3 ^{Aa}	8,2±0,4 ^{Ab}	7,7±0,4 ^{Ab}	7,5±0,2 ^{Ab}	7,4±0,4 ^{Ab}	8,4±0,5 ^{Ab}	8,4±0,2 ^{Ab}	8,1±0,5 ^{ABb}	7,8±0,1 ^{Bb}
	10	10,1±0,1 ^{Aa}	9,6±0,1 ^{Aa}	8,9±0,4 ^{Ab}	8,1±0,4 ^{Abc}	8,0±0,3 ^{Ac}	8,0±0,5 ^{Ac}	8,4±0,2 ^{Abc}	8,2±0,0 ^{Abc}	8,5±0,1 ^{Abc}	8,5±0,1 ^{Abc}
Coliformes to- tais Log (NMP / g carne)	0	1,9±0,5 ^{Ca}	1,9±0,5 ^{Ca}	1,9±0,5 ^{Ba}	1,9±0,5 ^{Ca}	1,9±0,5 ^{Ca}	1,9±0,5 ^{Ba}	1,9±0,5 ^{Ca}	1,9±0,5 ^{Ba}	1,9±0,5 ^{Ba}	1,9±0,5 ^{Aa}
	3	3,9±0,5 ^{Bab}	3,4±0,0 ^{Babcd}	2,4±0,1 ^{Bd}	3,3±0,1 ^{Babcd}	3,2±0,2 ^{Ba}	3,4±0,0 ^{Aabcd}	3,6±0,4 ^{Aabc}	4,0±0,3 ^{Aa}	2,6±0,4 ^{ABcd}	2,9±0,4 ^{Abcd}
	7	5,2±0,2 ^{Aa}	3,9±0,5 ^{Bb}	4,0±0,2 ^{Ab}	4,2±0,2 ^{Ab}	3,7±0,4 ^{ABb}	3,7±0,4 ^{Ab}	2,6±0,0 ^{Bc}	3,6±0,1 ^{Ab}	2,6±0,1 ^{ABc}	2,9±0,3 ^{Ac}
	10	5,6±0,4 ^{Ab}	6,4±0,1 ^{Aa}	3,4±0,1 ^{Ac}	3,6±0,4 ^{ABcd}	4,1±0,2 ^{Ac}	3,0±0,4 ^{Ad}	3,1±0,2 ^{ABde}	2,4±0,1 ^{Be}	3,2±0,1 ^{Ad}	3,0±0,3 ^{Ad}

*(A-D): Para cada parâmetro, médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$); (a-g): Para cada parâmetro, médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).

** OEA: Óleo essencial de alecrim; Qui: Quitosano; MMTNa: Montmorilonite sódica; MTV: microrganismos totais viáveis; NMP: número mais provável; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

A menor atividade dos filmes incorporados com a montmorilonite provavelmente está relacionada com a boa interação entre os componentes na matriz polimérica que diminui a migração dos compostos ativos para o alimento, reduzindo o poder protetor da embalagem. Este comportamento está de acordo com o anteriormente discutido nos ensaios de determinação “in vitro” das atividades antioxidante e antimicrobiana.

5.3.3. Estudo da qualidade microbiológica das carnes

Como era esperado, a contaminação microbiana da carne aumentou ao longo do tempo de armazenamento (Tabela 5.9). Em comparação com a carne sem filme, ao final do décimo dia de armazenamento, as amostras protegidas pelas películas ativas apresentaram reduções entre 1,2-2,1 log na contagem dos microrganismos totais viáveis.

Apesar das diferenças em termos de MTV entre as carnes embaladas com os diferentes filmes ativos de quitosano não ter sido estatisticamente significativa ($p>0,05$), numericamente as contaminações registradas no frango embalados nos filmes de quitosano sem incorporação do OEA foram superiores às verificadas nas amostras protegidas com os filmes com adição do óleo (Tabela 5.9).

Também na evolução do crescimento microbiano, a incorporação da MMTNa nos filmes de quitosano resultou num menor efeito protetor das películas e, a carne embalada nestes filmes apresentou maior contagem de MTV (embora sem significância estatística – $p>0,05$). De forma análoga ao referido nos ensaios de migração, na atividade antimicrobiana “in vitro” e estabilidade oxidativa das carnes, o aprisionamento dos compostos ativos na matriz polimérica devido à presença da nanoargila pode explicar a diminuição também da atividade antimicrobiana “in situ” dos filmes.

Abdollahi e colaboradores (2014) também observaram menores contagens de microrganismos totais viáveis nos filetes de peixe revestidos pelos filmes ativos de quitosano, tendo sido atribuído maior poder protetor aos filmes com incorporação de OEA, similarmente aos resultados aqui apresentados.

Em relação aos coliformes totais, houve um crescimento destas bacteriais ao longo do tempo de armazenamento ($p < 0,05$) em todas as carnes, protegidas ou não pelas películas, exceto para as amostras embaladas nos filmes Qui + MMTNa + 0,5% ou 2% OEA ($p > 0,05$) (Tabela 5.9). Comparando-se as carnes que não foram protegidas (carne sem filme) e as embaladas no PVC com as demais amostras envolvidas pelos filmes ativos de quitosano, conclui-se que os filmes de quitosano foram responsáveis por uma diminuição do crescimento dos coliformes totais entre 2,3-4,0 ciclos logarítmicos. No entanto, para os coliformes totais as menores contaminações foram registadas para as amostras protegidas pelos filmes de quitosano incorporados com OEA e MMTNa, apesar das diferenças não terem sido significativas entre as contaminações das carnes protegidas com os diferentes filmes ativos ($p > 0,05$). Estes resultados são concordantes com os apresentados para os MTV, e reforçam a explicação de que o OEA potencia o poder antimicrobiano dos filmes de quitosano.

Desta forma, a atividade antimicrobiana dos filmes está relacionada tanto com a atividade antimicrobiana do quitosano como com a atividade dos compostos ativos do OEA, como foi referido anteriormente nos resultados “in vitro”. Segundo Cannarsi *et al.* (2005), carnes de vaca com contagens de MTV superiores a 10^7 UFC/g de carne são consideradas impróprias para o consumo. Este também foi considerado como o limite microbiológico para rejeição de peixes frescos (Abdollahi *et al.*, 2014). Considerando esta contaminação como a limite antes da carne se tornar imprópria para o consumo, os filmes de Qui, Qui + 0,5%, 1% ou 2% OEA e Qui + 1% OEA + MMTNa foram capazes de aumentar a vida de prateleira das carnes neles embaladas, uma vez que nestas amostras este limite apenas foi excedido no sétimo dia de armazenamento, enquanto que para amostras embaladas nos demais filmes o valor foi excedido no terceiro dia de armazenamento.

5.4. Considerações finais

De um modo geral, os filmes produzidos apresentaram-se homogêneos, com boa transparência, densos, com boa dispersão/interação de todos os compostos incorporados na matriz polimérica, tendo o óleo essencial interferido com

maior intensidade nas propriedades funcionais dos filmes. A incorporação da nanoargila foi bem-sucedida, tendo sido obtida uma configuração intercalada, que resultou em melhorias nas propriedades dos filmes. De certa forma a MMTNa minimizou alguns dos efeitos negativos devidos à adição do OEA nos filmes (do ponto de vista mecânico, de barreira aos gases e à luz, por exemplo).

Através de uma análise combinada dos teores de MDA e MTV quantificados nas carnes de frango ao longo do tempo de armazenamento estudado pode-se observar o efeito protetor dos filmes e a possibilidade de extensão da vida útil do produto avaliado (Figura 5.12). A carne sem filme situou-se na zona de rejeição, tanto do ponto de vista oxidativo quanto microbiológico, desde o 3º dia de armazenamento, enquanto que as amostras protegidas pelos filmes ativo ainda se mantiveram nos quadrantes de aceitação.

Outra vantagem desta tecnologia situa-se na sua capacidade de suplementar a dieta dos consumidores com compostos de alto poder biológico, uma vez que os filmes ao libertarem os compostos fenólicos para o alimento enriquecem o mesmo (Medina-Jaramillo, Ochoa-Yepes, Bernal, e Famá, 2017).

Entretanto, do ponto de vista da bioatividade dos filmes, a nanoargila diminuiu tanto a atividade antioxidante quanto a antimicrobiana dos biopolímeros. Desta forma, quando a melhoria das propriedades não é um objetivo do material, filmes de quitosano incorporados apenas com OEA são sugeridos. Por outro lado, uma formulação que combine ambos os aspetos positivos pode ser destacada como o filme produzido com a incorporação da MMTNa e 0,5% de óleo essencial de alecrim.

Parte dos resultados presentes neste capítulo encontra-se já publicada em um artigo (Souza, Pires, *et al.*, 2018).

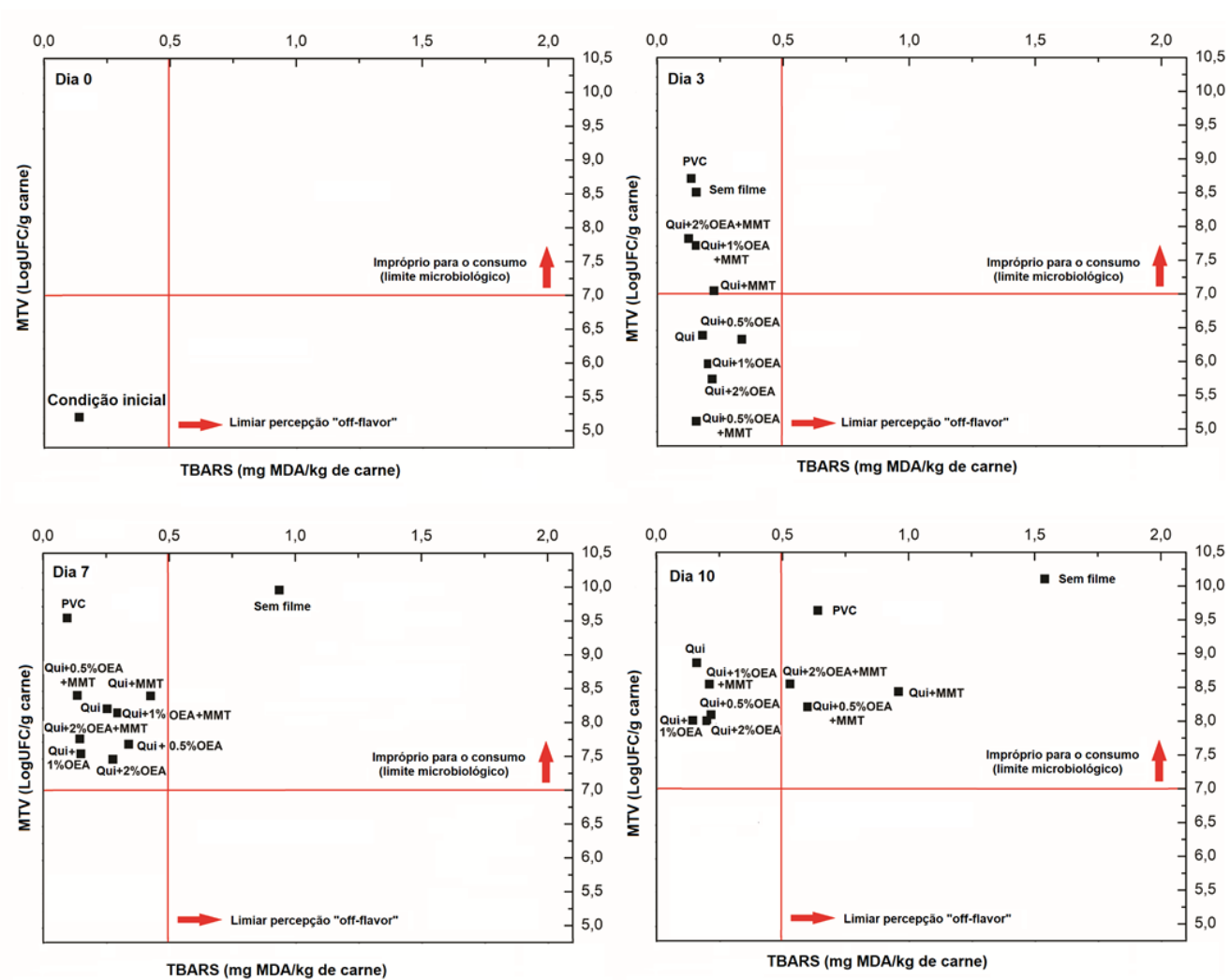


Figura 5.12. Estudo comparativo da qualidade microbiológica e grau de oxidação lipídica da carne de frango durante 10 dias de armazenamento.

6

Resultados e Discussão

Bio-nanocompósito quitosano / montmorilonite sódica / óleo essencial de gengibre

Neste capítulo são apresentados os resultados e discussão dos filmes produzidos com o segundo melhor extrato natural (OEG) e a melhor montmorilonite (MMTNa). Como os filmes controlo e quitosano + MMTNa são transversais aos capítulos cinco e seis, para não tonar o texto repetitivo, a discussão apresentada a seguir foi focada nas mudanças devidas à adição do OEG.

6.1. Caracterização das propriedades funcionais dos filmes

Filmes de quitosano incorporados com a montmorilonite sódica e o óleo essencial de gengibre foram produzidos de forma satisfatória, tendo sido obtidas películas finas, flexíveis, visualmente homogêneas, densas, de coloração predominante amarela e com elevada transparência como pode ser observado na figura 6.1.

6.1.1. Difractometria de Raios-X

Os difratogramas da MMTNa pura e dos filmes de quitosano puro (Qui) ou incorporados com a montmorilonite sódica (Qui+MMTNa) e o óleo essencial de

gengibre em diferentes concentrações (Qui+MMTNa+ 0,5%, 1% ou 2% OEG) estão dispostos na Figura 6.2.

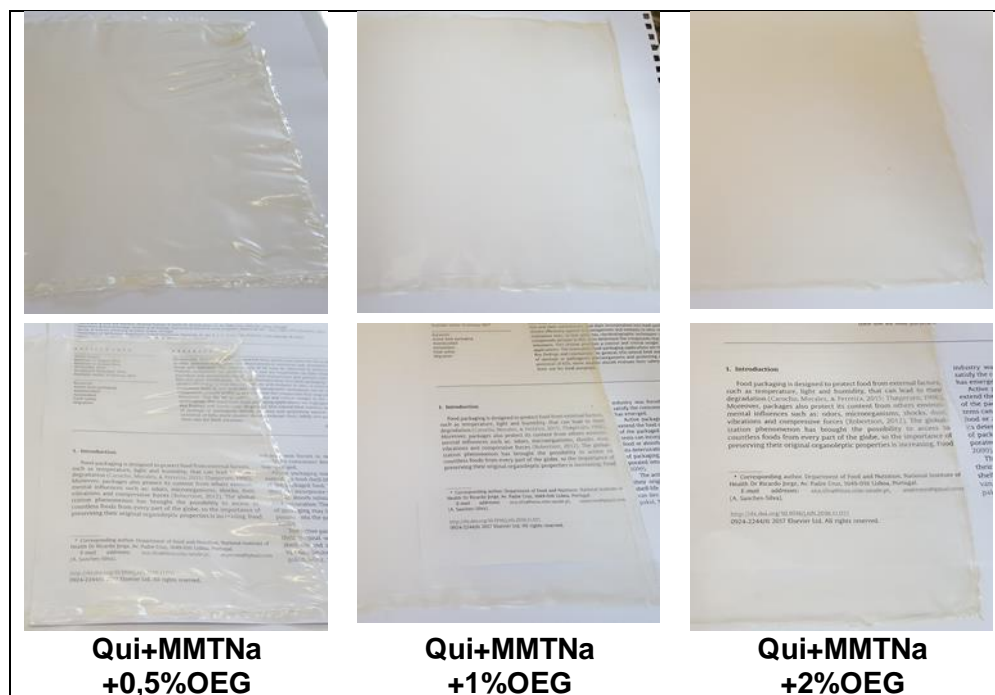


Figura 6.1. Ilustração dos bio-nanocompósitos produzidos. Qui (quitosano); MMTNa (montmorilonite sódica); OEG (óleo essencial de gengibre).

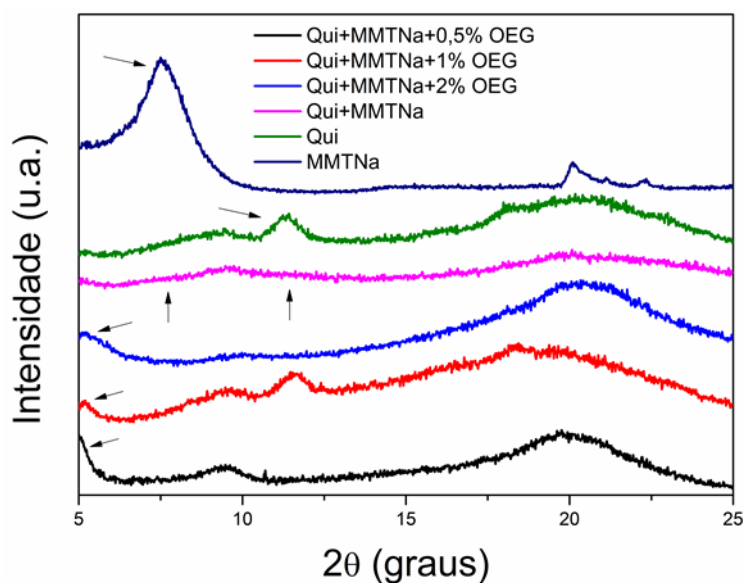


Figura 6.2. Difratomogramas dos bio-nanocompósitos. Qui (quitosano); MMTNa (montmorilonite sódica); OEG (óleo essencial de gengibre).

A incorporação do OEG resultou no deslocamento do pico cristalino característico da nanoargila para ângulos menores em torno de $2\Theta = 5,02^\circ$ (0,5% OEA), $5,18^\circ$ (1% OEA) e $5,22^\circ$ (2% OEA), correspondente a um espaçamento interplanar d_{001} igual a 1,76; 1,71 e 1,69 nm respetivamente. Valores similares

foram encontrados para a distância interplanar em filmes de quitosano incorporados com OEA (capítulo 5). O aumento das distâncias entre as lamelas da argila é um indicativo de que o quitosano foi capaz de intercalar-se entre as pilhas da MMTNa, com obtenção de uma estrutura intercalada (Lavorgna *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015). Entretanto como ocorrido com a incorporação do OEA, o óleo essencial de gengibre reduziu a dispersão do quitosano nas galerias da MMTNa, provavelmente devido a alterações estruturais no polímero devido às interações dos compostos fenólicos com os grupos reativos do quitosano (Dias *et al.*, 2014).

6.1.2. Caracterização morfológica dos filmes

6.1.2.1. Microscopia eletrônica de varrimento (MEV)

A morfologia da topografia da superfície e dos cortes transversais estão dispostos nas Figuras 6.3 e 6.4, respetivamente.

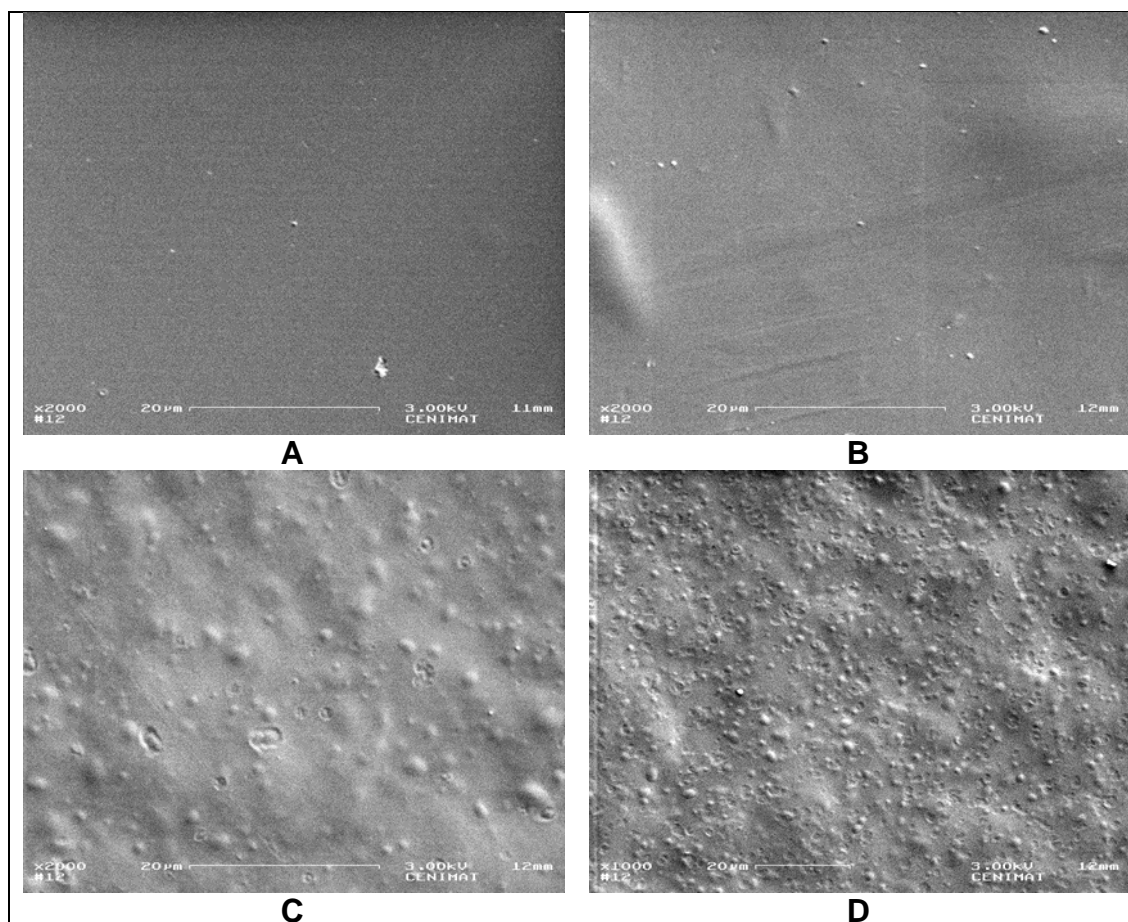


Figura 6.3. Fotomicrografias da topografia da superfície dos filmes: (A) quitosano; (B) quitosano + MMTNa; (C) quitosano + 2% OEG; (D) quitosano + 2% OEG + MMTNa. Ampliação de 1000x.

A superfície do filme controlo apresentou elevada uniformidade (Fig. 6.3A). A incorporação da MMTNa não resultou em modificação na homogeneidade do filme (Fig. 6.3B), no entanto a adição do OEG (2%) provocou uma certa descontinuidade na topografia dos filmes (Fig. 6.3C), que foi mais evidente quando a argila também foi incorporada (Figa. 6.3D).

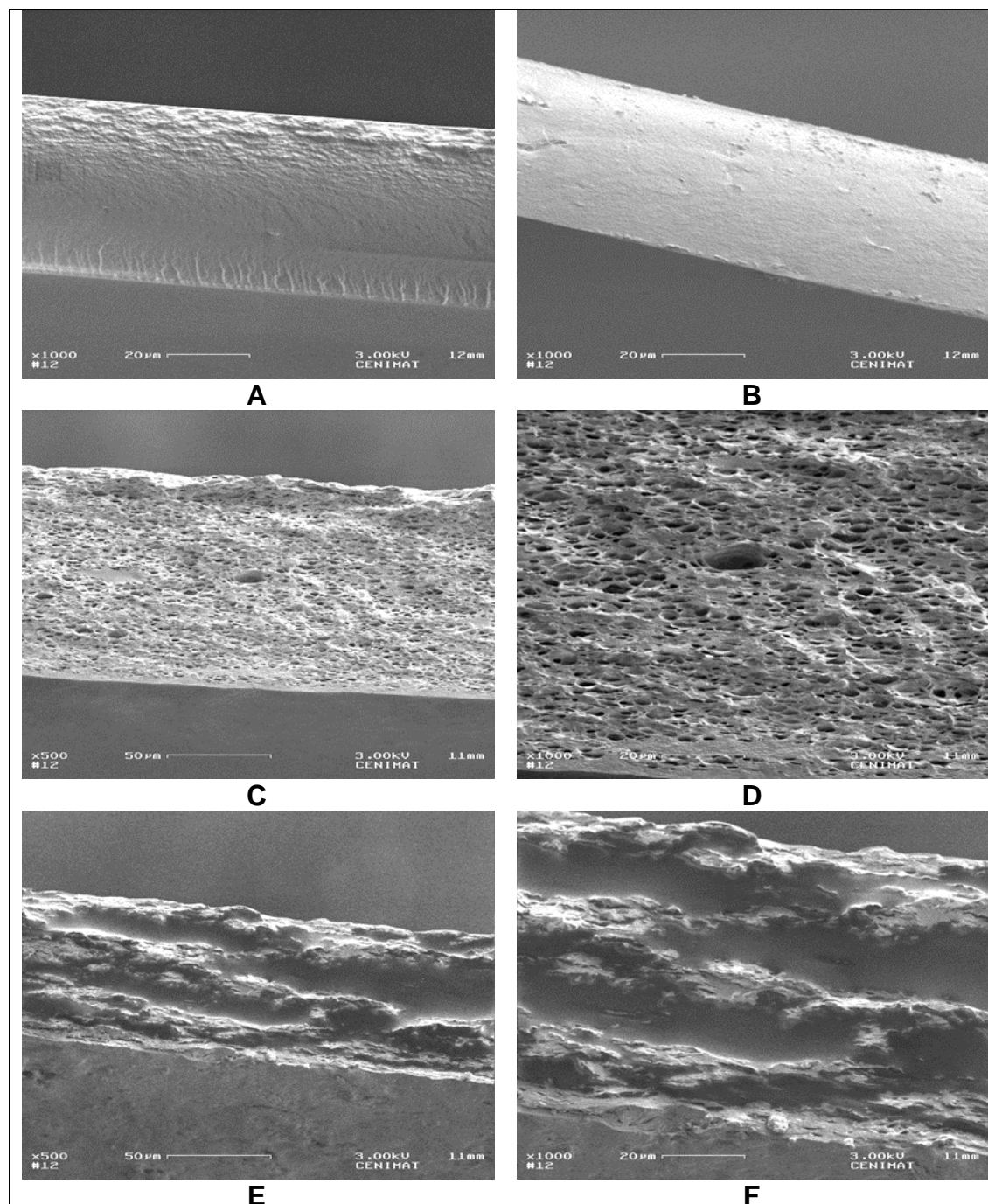


Figura 6.4. Fotomicrografias da secção transversal dos filmes: (A) quitosano; (B) quitosano + MMTNa; (C) quitosano + 2% OEG; (D) quitosano + 2% OEG; (E) quitosano + 2% OEG + MMTNa; (F) quitosano + 2% OEG + MMTNa. Ampliações 1000 x (A, B, D e F) e 500 x (C e E).

Esta superfície menos homogênea (maior irregularidade / menos lisa) pode ter sido resultado da presença de gotículas sob a superfície do filme (agregados internos) que alteraram a topografia do mesmo, o que corrobora os resultados de MFA apresentados a seguir.

Os cortes transversais (realizados por meio de fraturas sob azoto) dos filmes controlo (Fig. 6.4A) e quitosano + MMTNa (Fig. 6.4B) mostram elevada homogeneidade da estrutura polimérica obtida. A incorporação da MMTNa parece ter contribuído por tornar a rede ainda mais compacta, sendo um indício da obtenção de elevada interação quitosano x argila e corrobora os resultados de DRX. A incorporação do OEG na proporção de 2% resultou numa estrutura interna esponjosa (Fig. 6.4C e D). Quando foram adicionados ambos óleo e argila (Fig. 6.4E e F), houve uma completa mudança na estrutura da rede (com um aumento do espaçamento interno), no entanto com indícios de maior interação do que no filme apenas incorporado com OEG.

As figuras 6.4D e 6.4F (filmes de quitosano + 2% OEG com ou sem incorporação MMTNa, respetivamente) estão na mesma ampliação das figuras dos filmes controlo (Fig. 6.4A) e quitosano + MMTNa (Fig. 6.4B), no entanto possuem imagens maiores. Esta observação está relacionada com o aumento da espessura resultante da incorporação do óleo essencial, o que corrobora os resultados discutidos no capítulo 6.1.5.

6.1.2.2. Microscopia eletrónica de transmissão (MET)

O grau de esfoliação da nanoargila alcançado com o processo de agitação realizado pode ser observado nas imagens de MET (Figura 6.5).

A partir das imagens confirma-se a configuração esfoliada / intercalada assumida pela MMTNa na rede do quitosano, apesar de a dispersão não ter sido completamente homogênea, houve elevada interação, sendo possível observar que o polímero se encontra entre a estrutura da argila (partes mais claras da fotomicrografia). Estes resultados corroboram a análise de DRX discutida anteriormente. Em comparação com a imagem do filme de quitosano com 2% do OEA (capítulo 5) conclui-se que os filmes com OEG apresentam uma

configuração um pouco menos dispersa, com possível aglomeração da MMTNa, o que ajuda a explicar os melhores resultados mecânicos e de propriedade de barreira obtidos para os filmes com OEA/MMTNa.

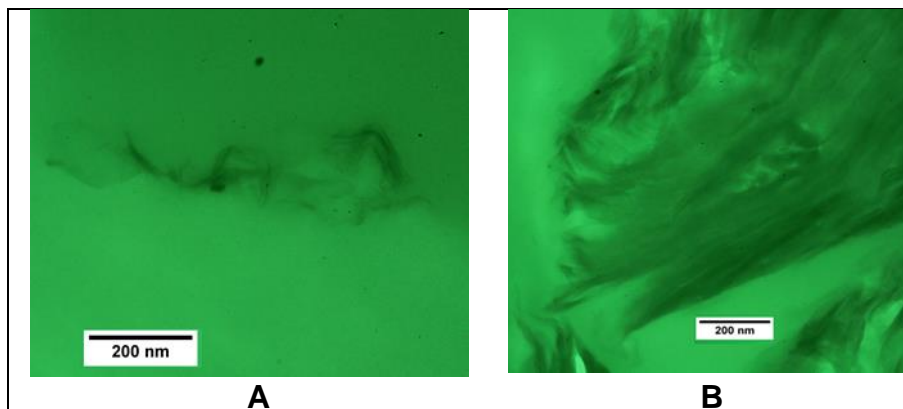


Figura 6.5. Fotomicrografias dos filmes obtidas por MET: (A) quitosano + MMTNa; (B) quitosano + MMTNa + 2% OEG. Ampliação de 50000x.

6.1.2.3. Microscopia de força atômica (MFA)

As imagens dos filmes obtidas por MFA estão dispostas na Figura 6.6. Os resultados são semelhantes aos observados no capítulo 5, tendo todos os filmes apresentado superfícies homogêneas, indicativo de boa interação entre os componentes dos bio-compósitos / nanocompósitos.

6.1.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Espectros de FT-IR dos filmes de quitosano puro e dos compósitos incorporados com MMTNa e/ou OEG estão dispostos na Figura 6.7. As bandas de absorção características do quitosano foram observadas em todos os espectros, nomeadamente: em 3325 cm^{-1} (estiramento axial do -OH); $3265\text{-}3277\text{ cm}^{-1}$ (estiramento assimétrico do grupo -NH); $2877\text{-}2925\text{ cm}^{-1}$ (ligação C-H do grupo metilo -NHCOCH₃); $1638\text{-}1642\text{ cm}^{-1}$ (amida I); $1551\text{-}1558\text{ cm}^{-1}$ (amida II); 1342 cm^{-1} (vibração esquelética envolvendo o estiramento da ligação C-N da amida III); $1375\text{-}1412\text{ cm}^{-1}$ (-CH₂ dobramento); $906\text{-}1024\text{ cm}^{-1}$ (vibração esquelética envolvendo o estiramento do grupo C-O) e 1134 cm^{-1} (estiramento assimétrico das pontes de C-O-C) (Ávila *et al.*, 2012; Silva-Weiss *et al.*, 2013; Woranuch e Yoksan, 2013). De modo similar ao observado para os filmes com incorporação

do OEA discutidos no Capítulo 5, para os filmes com OEG também não foram verificadas grandes diferenças entre os espectros dos filmes com a incorporação tanto da argila quanto do óleo, tendo prevalecido os picos característicos do quitosano. Pequenas alterações nas intensidades dos picos de absorção foram registradas, as quais são atribuídas à sobreposição de ligações químicas, e desta forma um indicativo da presença de forte interação entre as moléculas dos diferentes componentes do material (quitosano, MMTNa e os compostos ativos presentes no OEG) (Bonilla e Sobral, 2016).

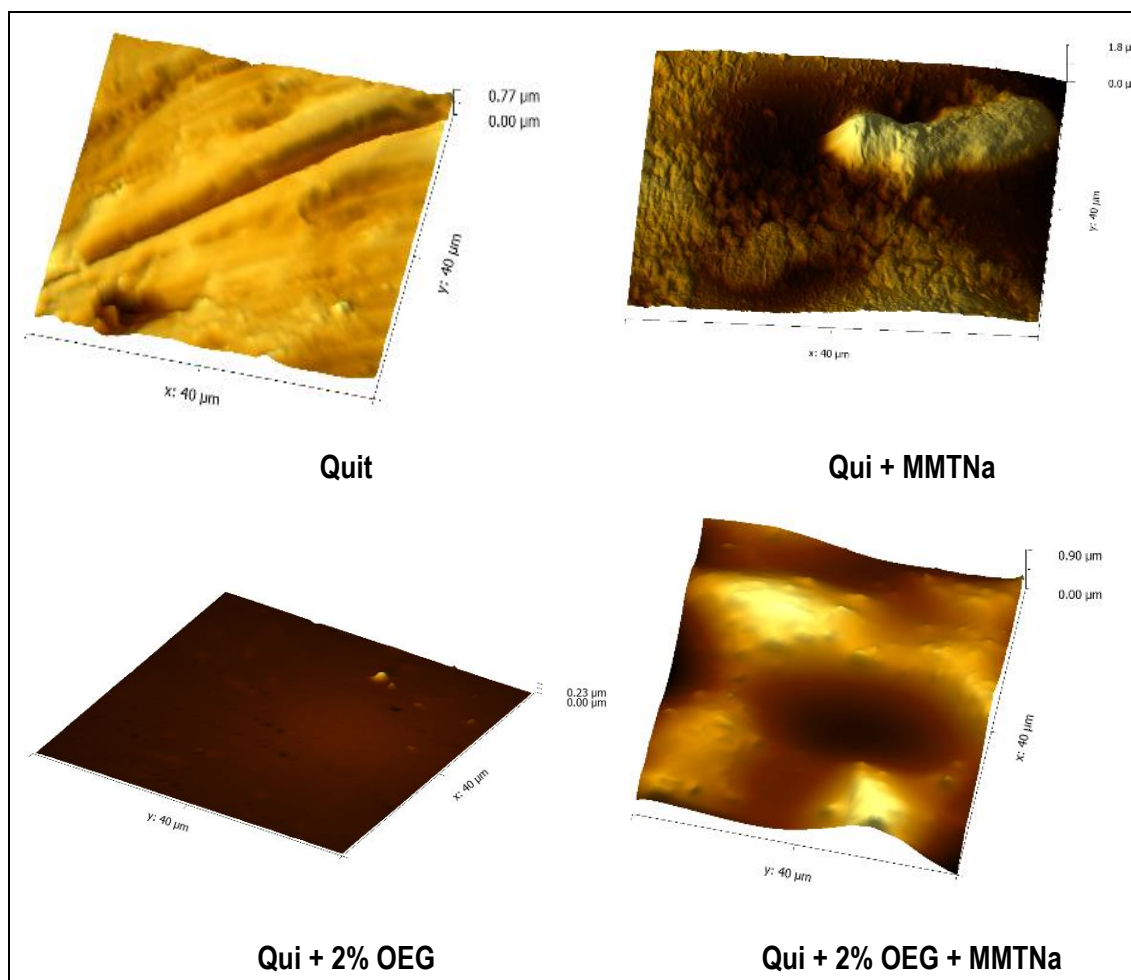


Figura 6.6. Fotomicrografias da topografia dos filmes obtidas por MFA.

Os espectros dos filmes incorporados com OEG apresentam um novo pico entre $1702\text{-}1703\text{ cm}^{-1}$ que corresponde à vibração do estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$, tendo a intensidade deste pico aumentado com o aumento da concentração do óleo, o que é um indício de que houve interações entre os compostos fenólicos presentes no OEG e os grupos hidroxilo e amina do quitosano (Qin et

al., 2015). O aparecimento deste novo pico assim como o deslocamento de picos para comprimentos de onda diferentes (como observado entre 860-880 cm^{-1} ou 1250-1300 cm^{-1} por exemplo) com a incorporação do OEG são indicativos de que novas ligações covalentes entre o quitosano e os compostos ativos do OEG / MMTNa aconteceram (Sun *et al.*, 2017).

Estes resultados corroboram as observações obtidas nas análises de DRX, MEV, MET assim como as modificações nas propriedades funcionais dos filmes produzidos.

6.1.4. Avaliação das propriedades térmicas

As temperaturas de transição vítrea (temperatura de relaxamento das cadeias poliméricas) assim como as perdas de massa com as respectivas temperaturas máximas de degradação foram determinadas por meio dos ensaios DSC e TGA, respetivamente. Os resultados do estudo das propriedades térmicas estão dispostos na Tabela 6.1 e Figura 6.8. A temperatura de transição vítrea dos filmes não variou estatisticamente com a incorporação da MMTNa ou do OEG ($p>0,05$) (Tabela 6.1), tendo sido observado um valor médio de $199\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 14\text{ }^{\circ}\text{C}$. No entanto, observou-se uma tendência de diminuição da T_g com a incorporação do OEG e da nanoargila, uma indicação de um maior relaxamento das cadeias poliméricas, provavelmente devido ao efeito plastificante do óleo (Sakurai, 2000). Estes resultados corroboram os apresentados anteriormente para os filmes de quitosano incorporados com OEA (capítulo 5), assim como os resultados mecânicos discutidos no capítulo 6.1.5.

A degradação térmica dos filmes seguiu o mesmo comportamento demonstrado para os filmes incorporados com OEA (capítulo 5), ou seja, filmes sem adição do óleo essencial apresentaram três eventos de degradação térmica, enquanto que os biopolímeros adicionados do OEG registaram quatro estágios (Fig. 6.8).

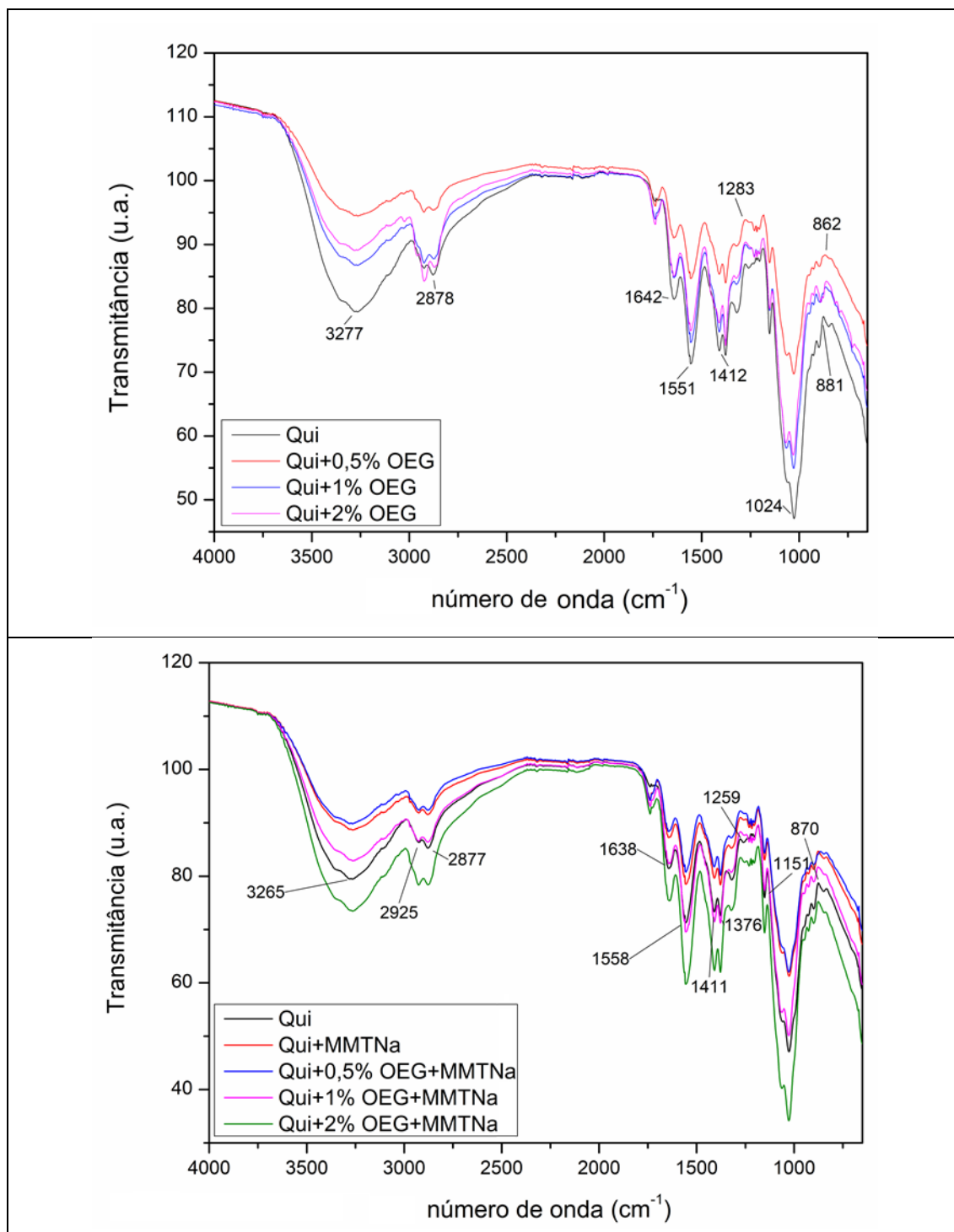


Figura 6.7. Espectro FT-IR dos bio-nanocompósitos. Qui (quitosano); OEG (óleo essencial de gengibre); MMTNa (montmorilonite sódica).

Tabela 6.1. Temperatura de transição vítrea, temperaturas de degradação térmica e perdas de massa dos bio-nanocompósitos.

Filme	Tg (°C)	$\Delta 1$		$\Delta 2$		$\Delta 3$		$\Delta 4$		Resíduo (%)
		Td (°C)	ΔM (%)	Td (°C)	ΔM (%)	Td (°C)	ΔM (%)	Td (°C)	ΔM (%)	
Qui*	206,7 \pm 3,7 ^{ns**}	70,9 \pm 2,5	6,5 \pm 0,0	170,1 \pm 1,5	12,6 \pm 0,8	283,6 \pm 0,7	24,3 \pm 0,6	-	-	23,6 \pm 0,4
Qui+MMTNa	188,9 \pm 6,7 ^{ns}	63,6 \pm 2,4	6,4 \pm 0,8	173,2 \pm 0,8	14,0 \pm 0,8	283,5 \pm 0,5	23,2 \pm 0,2	-	-	25,8 \pm 0,1
Qui+0,5%OEG	202,2 \pm 2,7 ^{ns}	65,6 \pm 2,4	6,1 \pm 0,2	174,1 \pm 2,1	13,7 \pm 0,1	284,0 \pm 1,0	20,4 \pm 0,4	407,4 \pm 5,6	26,6 \pm 0,6	18,0 \pm 0,1
Qui+MMTNa+0,5%OEG	202,8 \pm 5,4 ^{ns}	64,0 \pm 0,0	6,2 \pm 0,3	168,4 \pm 3,2	11,5 \pm 0,6	284,0 \pm 0,9	20,4 \pm 0,0	407,8 \pm 0,4	26,9 \pm 0,4	20,2 \pm 0,4
Qui+1%OEG	194,4 \pm 7,1 ^{ns}	63,2 \pm 1,5	4,9 \pm 0,2	167,4 \pm 1,3	11,1 \pm 2,7	284,1 \pm 2,5	19,9 \pm 1,7	397,1 \pm 6,2	27,1 \pm 5,7	16,9 \pm 0,8
Qui+MMTNa+1%OEG	196,2 \pm 3,4 ^{ns}	64,8 \pm 1,9	4,7 \pm 0,1	172,6 \pm 3,7	16,1 \pm 0,3	290,8 \pm 1,1	25,2 \pm 0,4	409,5 \pm 2,6	26,9 \pm 0,8	17,7 \pm 0,3
Qui+2%OEG	195,5 \pm 4,8 ^{ns}	59,6 \pm 6,3	4,1 \pm 0,2	135,5 \pm 3,2	13,1 \pm 1,3	284,8 \pm 0,7	33,0 \pm 0,5	407,1 \pm 3,2	25,0 \pm 0,6	14,2 \pm 1,0
Qui+MMTNa+2%OEG	194,3 \pm 6,8 ^{ns}	63,7 \pm 0,9	5,0 \pm 0,2	183,4 \pm 2,5	16,6 \pm 0,6	287,7 \pm 0,5	23,2 \pm 0,9	408,7 \pm 3,1	25,9 \pm 0,6	18,0 \pm 0,4

*Montmorilonite sódica (MMTNa); óleo essencial de gengibre (OEG); Temperatura de transição vítrea (Tg); Temperatura de decomposição (Td); Perda de massa (ΔM).

** ns: diferença não significativa ao nível de 5% de probabilidade ($p>0,05$).

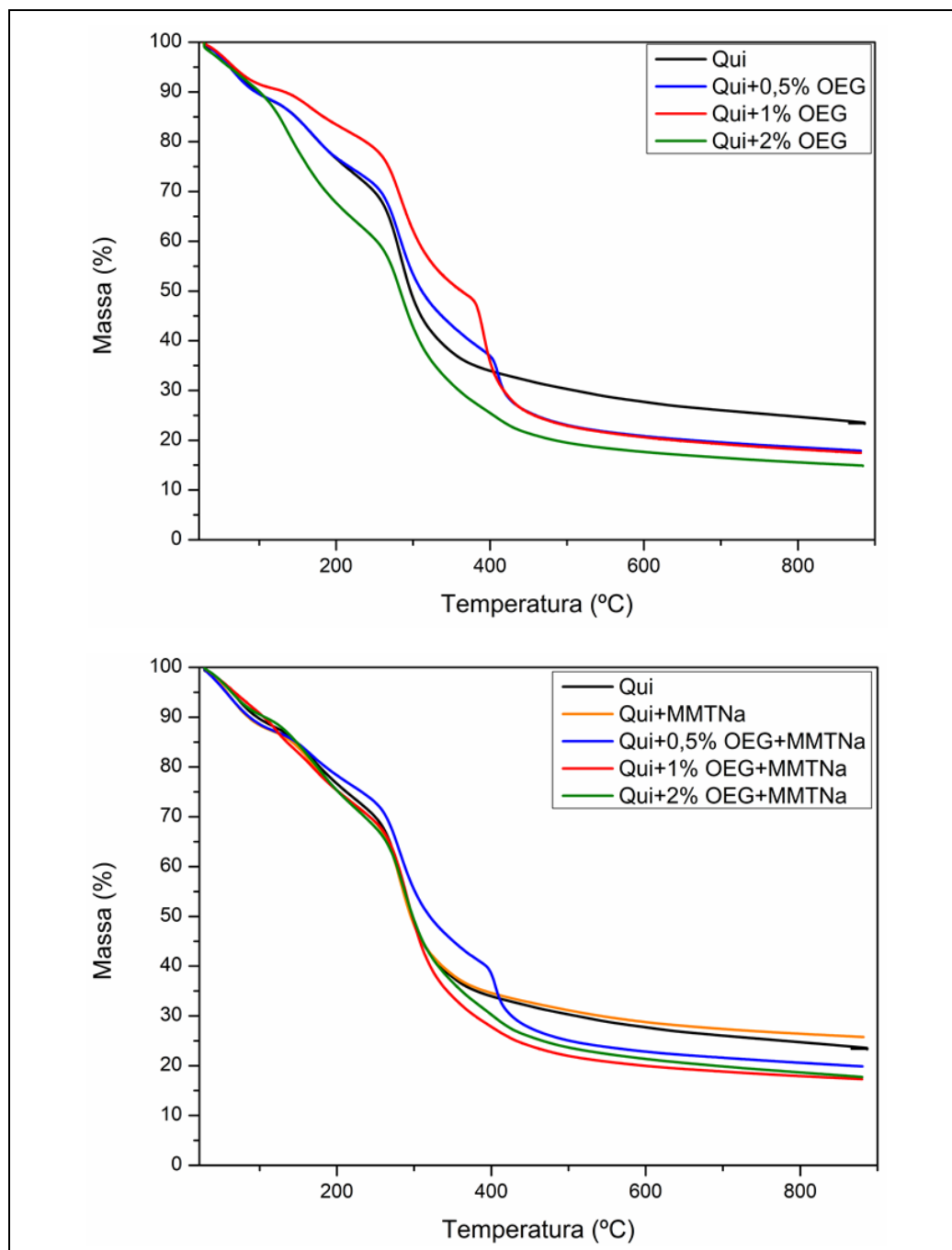


Figura 6.8. Análise termogravimétrica dos bionanocompósitos – perda de massa em função da temperatura. Qui (quitosano); MMTNa (montmorilonite sódica); OEG (óleo essencial de gengibre).

O primeiro evento térmico ocorreu em temperaturas médias entre 59,6-70,9 °C com perdas de massa entre os 4,1-6,5%. A perda de massa neste primeiro estágio está relacionada com a evaporação da água e do ácido acético residual presente na matriz polimérica. A menor perda de massa observada com a incorporação do OEG provavelmente foi devida ao menor conteúdo de água

resultante da incorporação dos compostos de natureza hidrofóbica presente no óleo essencial (Tongnuanchan, Benjakul, e Prodpran, 2013). O segundo estágio de degradação térmica (135,5-183,4 °C), o qual corresponde a uma perda de massa entre os 11,1-16,6%, está relacionado com a decomposição de componentes de baixo peso molecular ou estruturalmente ligados à água na rede polimérica do quitosano (Alizadeh *et al.*, 2018).

A terceira, e maior perda de massa (19,9-33%) ocorreu em temperaturas entre 283,5-290,8 °C, e está associada à degradação do quitosano (o componente principal dos bio-compósitos). A incorporação do OEG aumentou ligeiramente a estabilidade térmica do filme, visto que a temperatura máxima de degradação neste estágio foi superior nas películas incorporadas com o OEG. Este resultado está de acordo com o observado em filmes de carboximetil-celulose / quitosano incorporados com óleo de gengibre (Noshirvani *et al.*, 2017). Estes autores atribuíram o aumento da estabilidade térmica ao aumento da organização da matriz polimérica (isto é, à uma estrutura mais homogênea) com a incorporação do OEG, o que resulta em maiores temperaturas de degradação térmica.

A incorporação da MMTNa, semelhante ao ocorrido para os filmes incorporados com OEA (cap. 5), atuou como uma barreira térmica, proporcionando menores perdas de massa, como pode ser observado no resíduo final do processo térmico. Este resultado está de acordo com o reportado na literatura (Lewandowska, Sionkowska, Kaczmarek, e Furtos, 2014).

6.1.5. Avaliação da espessura e das propriedades mecânicas

Na ausência de OEG a espessura dos filmes não foi afetada pela incorporação da MMTNa ($p > 0,05$) (Tabela 6.2). Contudo, de um modo geral os valores médios das espessuras dos filmes com MMTNa foram ligeiramente menores do que dos filmes sem o nanorreforço, tendo sido significativa em alguns casos (Qui+MMTNa+ 0,5% ou 2% OEG) ($p < 0,05$). Como verificado nos ensaios de DRX, os filmes com incorporação da MMTNa e do OEG apresentaram indícios de obtenção de uma configuração intercalada (parcialmente esfoliada), que se caracteriza pela formação de fortes ligações entre o polímero e a argila devida a

penetração das cadeias do quitosano entre os espaçamentos das galerias da MMT (Beigzadeh Ghelejlou *et al.*, 2016), possibilitando a formação de uma estrutura compacta, que desta forma minimizou o aumento da espessura devida a incorporação do OEG.

Tabela 6.2. Espessura e propriedades mecânicas dos filmes sem ou com incorporação de montmorilonite sódica (MMTNa) e óleo essencial de gengibre (OEG).

OEG (%)	Espessura (μm)		TM** (MPa)	
	0% MMTNa	2,5% MMTNa	0% MMTNa	2,5% MMTNa
0	41,7 \pm 2,9 ^{Da}	39,5 \pm 2,0 ^{Ca}	46,7 \pm 1,7 ^{Ab}	66,6 \pm 3,1 ^{Aa}
0,5	55,5 \pm 1,3 ^{Ca}	52,5 \pm 0,6 ^{Bb}	46,3 \pm 5,1 ^{Aa}	42,0 \pm 4,2 ^{Ba}
1,0	68,2 \pm 3,1 ^{Ba}	67,4 \pm 1,1 ^{Aa}	27,2 \pm 5,8 ^{Ba}	34,6 \pm 1,0 ^{BCa}
2,0	81,3 \pm 4,5 ^{Aa}	68,6 \pm 0,9 ^{Ab}	32,1 \pm 3,9 ^{Ba}	30,3 \pm 0,7 ^{Ca}
OEG (%)	%E		ME (GPa)	
	0% MMTNa	2,5% MMTNa	0% MMTNa	2,5% MMTNa
0	17,9 \pm 1,2 ^{Bb}	33,5 \pm 2,5 ^{Aa}	2,05 \pm 0,19 ^{Aa}	1,86 \pm 0,14 ^{Aa}
0,5	23,8 \pm 5,3 ^{ABa}	22,3 \pm 2,9 ^{Ba}	1,66 \pm ,012 ^{Aa}	1,30 \pm 0,30 ^{Ba}
1,0	36,0 \pm 9,4 ^{Aa}	33,1 \pm 2,3 ^{Aa}	0,30 \pm 0,09 ^{Cb}	0,88 \pm 0,13 ^{BCa}
2,0	33,6 \pm 6,6 ^{ABa}	35,8 \pm 1,3 ^{Aa}	0,71 \pm 0,15 ^{Ba}	0,47 \pm 0,05 ^{Ca}

* (A-C): Entre cada parâmetro, médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p<0,05$); (a-b) Entre cada parâmetro, médias na mesma linha seguidas por diferentes letras diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p<0,05$).

** Tensão máxima na rotura (TM); Módulo de elasticidade (ME), %E (percentagem de alongação).

Por outro lado, a incorporação do OEG resultou num aumento significativo no calibre dos filmes, tendo sido observado um efeito de concentração, ou seja, quanto maior o teor do óleo maiores foram as espessuras das amostras ($p<0,05$) (Tabela 6.2). Este comportamento pode ser explicado devido ao maior conteúdo de sólidos por unidade de superfície (Perdones *et al.*, 2014), ou devida às interações entre o quitosano e os compostos ativos presentes nos extratos bioativos que podem ter reduzido o alinhamento das cadeias poliméricas, reduzindo a compactação da rede formada (Tongnuanchan *et al.*, 2013), e consequentemente aumentando a espessura dos filmes.

Peng e Li (2014) observaram um aumento na espessura de filmes de quitosano devido à incorporação de 1% de três diferentes óleos essenciais. Os filmes de quitosano puro apresentaram uma espessura média de 77 μm enquanto que nos tratamentos com incorporação do óleo essencial de citronela, de tomilho

ou de canela, as espessuras registadas foram de 97, 101 e 99 μm respetivamente. Ou seja, um aumento de cerca de 30% em comparação com o controlo. Em nossos resultados para o mesmo teor de OE, os filmes apresentaram um aumento na espessura de cerca de 62%. Em outro estudo, também com filmes de quitosano incorporados com uma mistura de óleo essencial de gengibre e canela (1:1) em diferentes concentrações (0,05%, 0,2% ou 1%), a espessura das películas produzidas variou significativamente devido à adição dos OEs (entre 68 a 105 μm) (Wang *et al.*, 2017). Esta variação representa um aumento de 54% na espessura com a adição de 1% da mistura dos óleos testados, ou seja, um resultado mais próximo dos 62% encontrados neste trabalho.

Os parâmetros mais comuns que descrevem as propriedades mecânicas de filmes edíveis são a tensão máxima na rotura (TM), a percentagem de alongamento na rotura (%E) e o módulo de elasticidade ou de *Young* (ME), os quais estão fortemente relacionados com a estrutura química dos filmes. A TM indica a resistência às forças de tração, a %E corresponde a capacidade de deformação plástica das películas, enquanto que o ME avalia a rigidez dos materiais (Acevedo-Fani, Salvia-Trujillo, Rojas-Graü, e Martín-Belloso, 2015; Sarantópoulos *et al.*, 2002).

Os resultados dos parâmetros mecânicos avaliados (TM, %E e ME) estão dispostos na Tabela 6.2. De um modo geral as variações nas propriedades mecânicas foram devidas principalmente à incorporação do OEG. Nos filmes onde não foram incorporados os extratos naturais (Qui e Qui + MMTNa) a nanoargila aumentou a resistência à tração dos biopolímeros assim como a sua plasticidade ($p < 0,05$), sem, no entanto, ter interferido na rigidez das amostras ($p > 0,05$) (Tabela 6.2), como já foi discutido no capítulo anterior.

Por outro lado, a incorporação do óleo essencial de gengibre tornou os filmes de quitosano menos resistentes à tração, mais elásticos e menos rígidos. Em relação à TM, houve uma redução entre 0,6-31,6% (para os filmes com OEG entre 0,5% e 2% de OEG) (Tabela 6.2). A incorporação da MMTNa não resultou em diferença na RM dos filmes também adicionados de OEG ($p > 0,05$). A incorporação de lípidos na matriz polimérica de filmes induz a formação de estruturas

heterogêneas e descontínuas, o que afeta a resistência mecânica dos polímeros pela substituição parcial das fortes ligações polares quitosano-quitosano (entre as moléculas de quitosano) por interações mais fracas entre quitosano-OEG (moléculas ativas presentes no OEG) (Atarés e Chiralt, 2016).

Diversos autores reportam uma redução na TM de diferentes biopolímeros devida à incorporação de óleos essenciais em sua estrutura (OEs de gengibre e de canela em filmes de caseinato de sódio (Atarés, Bonilla, e Chiralt, 2010), OE de orégão em filmes à base de proteínas extraídas do triticale (Aguirre, Borneo, e León, 2013) ou OEs extraídos de raízes (gengibres e açafrão) incorporados em filmes de gelatina extraída de pele de peixes (Tongnuanchan *et al.*, 2013)). Este comportamento também foi observado com menor intensidade nos filmes de quitosano incorporados com OEA (discutido no capítulo anterior), provavelmente devido às diferentes composições químicas dos óleos (Atarés e Chiralt, 2016).

Em relação à percentagem de alongação, a incorporação do OEG resultou no aumento da extensibilidade dos filmes ($p < 0,05$), provavelmente devido à descontinuidade da matriz polimérica devido as interações mais fracas entre as moléculas de quitosano e os componentes do OE, como discutido anteriormente. A incorporação da MMTNa, novamente também não resultou em mudanças nesta propriedade ($p > 0,05$), tendo a %E dos filmes com as mesmas concentrações de OEG incorporados ou não com a MMTNa, não terem diferidos entre si (Tabela 6.2).

Desta forma, o óleo essencial de gengibre provavelmente atuou como um plastificante na medida em que diminuiu a força dos filmes enquanto aumentou a sua plasticidade (capacidade de alongar antes da rotura). Adicionalmente, este efeito plastificante dos OEs em biopolímeros é influenciado pelos teores dos extratos incorporados na matriz polimérica (Tongnuanchan *et al.*, 2013), como pôde ser observado nos resultados apresentados na Tabela 6.2, maiores mudanças nas propriedades mecânicas foram observadas com as maiores concentrações de OEG incorporadas.

Materiais menos resistentes à tração, com maior plasticidade, são também menos rígidos, o que foi observado também para os filmes de quitosano com a incorporação do OEG (redução do módulo de elasticidade $p < 0,05$) (Tabela 6.2). Comportamento semelhante foi observado em filmes de quitosano com incorporação de óleo essencial de canela (Perdones *et al.*, 2014).

6.1.6. Avaliação das propriedades de barreira dos filmes – permeabilidade do vapor de água (PVA) e do oxigénio (PO)

É desejável que materiais de embalagens apresentem boas propriedades de barreira, seja à luz, aos gases ou ao vapor de água, de modo a exercer a sua função como proteção física contra o meio externo possibilitando a extensão da vida de prateleira dos alimentos embalados (Soares *et al.*, 2009; Vilarinho *et al.*, 2018).

O quitosano, por ser um polissacárido catiónico, gera polímeros com fortes interações na cadeia polimérica, que muitas vezes restringem/diminuem a sua movimentação, resultando em boas barreiras de oxigénio (Miller e Krochta, 1997). No entanto, também possibilitam que pontes de hidrogénio ocorram com a água, e que haja absorção da mesma (absorção de água rompe as interações intermoleculares entre as cadeias do polímero), desta forma em condições de elevadas humidades relativas aumentam-se as velocidades de transmissão de água e a permeabilidade em geral (Atarés, Pérez-Masiá, e Chiralt, 2011).

A permeabilidade do vapor de água não variou com a incorporação da MMTNa ou do OEG ($p > 0,05$), exceto para o filme incorporado com 2% do óleo e com a nanoargila que apresentou uma menor barreira ao vapor de água quando comparado com os filmes controlo ou Qui+MMTNa ($p < 0,05$), entretanto, esta diferença não foi significativa em relação aos outros filmes também incorporados com o OEG ou com OEG + MMTNa ($p > 0,05$) (Tabela 6.3).

Tabela 6.3. Propriedades de barreira e óticas dos bio-nanocompósitos.

Filme	PVA (10^{-11} mol/m·s·Pa)	PO (10^{-16} mol/m·s·Pa)	Cromaticidade	hue*	Opacidade
Qui***	1,40±0,09 ^{C*}	0,184±0,052 ^{DE}	3,1±0,1 ^D	129,0±1,0 ^A	1,1±0,2 ^C
Qui+MMTNa	1,75±0,10 ^{BC}	0,098±0,008 ^F	4,2±0,4 ^C	118,8±1,8 ^B	1,7±0,3 ^C
Qui+0,5% OEG	1,93±0,36 ^{ABC}	0,182±0,008 ^{DE}	5,8±0,3 ^B	112,3±0,6 ^C	2,6±0,1 ^B
Qui+MMTNa+0,5% OEG	1,94±0,27 ^{ABC}	0,171±0,001 ^E	6,8±0,6 ^B	109,8±1,4 ^{CD}	3,1±0,7 ^B
Qui+1% OEG	1,95±0,21 ^{ABC}	0,255±0,010 ^{BC}	7,0±0,8 ^B	110,2±1,3 ^{CD}	4,1±0,1 ^{AB}
Qui+MMTNa +1% OEG	2,12±0,08 ^{AB}	0,246±0,013 ^{CD}	8,0±0,2 ^{AB}	107,9±0,1 ^{DE}	5,0±0,2 ^{AB}
Qui+2% OEG	1,94±0,10 ^{ABC}	0,325±0,037 ^A	9,6±1,9 ^A	107,1±1,8 ^{DE}	4,2±1,4 ^{AB}
Qui+MMTNa+2% OEG	2,41±0,16 ^A	0,285±0,015 ^{AB}	9,7±1,3 ^A	105,1±0,7 ^E	6,2±1,8 ^A

** (A-B): Médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p<0,05$);

*** Montmorilonite sódica (MMTNa); óleo essencial de gengibre (OEG); Permeabilidade ao vapor de água (PVA); Permeabilidade ao oxigénio (PO).

Embora não tenha havido significância estatística entre as diferenças dos resultados de PVA dos filmes, houve uma tendência de aumento da permeabilidade ao vapor de água tanto pela incorporação do óleo quanto da MMTNa. Apesar de não ter sido observado o efeito da concentração do OEG nesta mudança quando a MMTNa não foi incorporada (as PVAs dos filmes sem incorporação da nanoargila e com diferentes quantidades de OEG praticamente foram iguais, em torno dos $1,94 \times 10^{-11}$ mol/m·s·Pa).

A incorporação de substâncias hidrofóbicas (OEG) nos filmes deveria reduzir a PVA, uma vez que o processo de transferência do vapor de água depende da razão entre os constituintes hidrofílicos/hidrofóbicos (Baldwin, Hagenmaier, e Bai, 2012). No entanto, o contrário foi observado, tendo a permeabilidade do vapor de água aumentado com a incorporação do OEG. Atarés e colaboradores (2011) observaram também um aumento na PVA de filmes de hidroximetilcelulose incorporados com OEG quando os ensaios foram realizados a 35 °C, temperatura semelhante à utilizada neste ensaio. Segundo estes autores o estado físico em que o óleo essencial se encontra é determinante nos efeitos causados na PVA. Para baixas temperaturas ocorre uma diminuição da permeabilidade, enquanto que para temperaturas mais elevadas, quando o óleo se encontra no estado líquido, ele pode favorecer a mobilidade molecular da cadeia polimérica, promovendo o transporte de moléculas pelo filme emulsionado (Atarés *et al.*, 2011). Perdonés e colaboradores, (2014) atribuíram o aumento na PVA dos filmes de quitosano com a incorporação de óleo essencial de canela às possíveis interações entre os componentes do OE e o quitosano que tornaram a matriz polimérica mais aberta ao transporte de moléculas de água, ao mesmo tempo que plastificam o filme produzido. Estes resultados corroboram os apresentados neste estudo.

Em relação à permeabilidade do oxigênio, a incorporação do OEG diminuiu a barreira a este gás, semelhante ao observado com o OEA (capítulo 5). É provável que o OEG tenha desempenhado uma função plastificante nos filmes de quitosano, na medida que aumentou a capacidade de alongação do material (como discutido anteriormente) e a permeabilidade tanto do oxigênio quanto do vapor de água. Os plastificantes atuam como lubrificantes internos reduzindo as

forças de fricção entre as cadeias do polímero, e aumentando o espaço intermolecular, permitindo assim uma maior mobilidade das cadeias poliméricas e consequentemente facilitando o transporte dos gases (Nouri *et al.*, 2017; Perdonés *et al.*, 2014).

Comportamento semelhante foi observado em filmes de quitosano incorporado com óleo essencial de canela (Perdonés *et al.*, 2014), ou em filmes de hidroxipropil-metilcelulose incorporado com OEG (Atarés *et al.*, 2011). O estado líquido dos óleos essenciais, assim como seu caráter hidrofóbico facilitam o transporte do oxigénio através do filme devido ao aumento da sua solubilidade na matriz polimérica (Atarés *et al.*, 2011). A MMTNa desempenhou um papel semelhante ao ocorrido para os filmes com OEA, tendo ajudado a diminuir o efeito negativo da incorporação do OEG na barreira ao oxigénio. Em comparação com a película comercial EVOH, considerada uma das embalagens de melhor barreira ao oxigénio, os filmes com incorporação do OEG apresentam PO na mesma ordem de grandeza do EVOH ($0,24 \times 10^{-16} \text{ mol} \cdot \text{m} \cdot \text{s} \cdot \text{Pa}$) (Cerisuelo *et al.*, 2012), demonstrando o potencial destes filmes na proteção à exposição ao oxigénio, e por consequência aos processos oxidativos catalisados por este gás.

6.1.7. Avaliação das propriedades óticas

A cromaticidade, o hue* e a opacidade dos filmes controlo ou incorporados com OEG e ou MMTNa estão dispostos na Tabela 6.3. A incorporação do OEG ou da MMTNa resultou numa diminuição dos valores de hue* (ou seja, filmes de coloração mais amarela), e um aumento na sua opacidade e saturação de cor (ou seja, maior cromaticidade) ($p < 0,05$). Estes resultados são semelhantes aos observados no capítulo anterior para os filmes incorporados com o OEA, assim como o reportado para filmes de quitosano incorporado com OE de canela (Perdonés *et al.*, 2014), citronela ou tomilho (Peng e Li, 2014).

A ligação de diferentes moléculas na cadeia do polímero modifica as propriedades do material também em termos de absorção da luz (Moradi *et al.*, 2012), como observado em filmes de quitosano incorporados com extratos naturais ricos em compostos fenólicos (Siripatrawan e Harte, 2010). Segundo Acevedo-Fani *et al.* (2015) as gotículas do óleo presentes internamente na matriz

polimérica podem aumentar o espalhamento da luz na interface das gotas, resultando num aumento dos valores de opacidade do material.

Os espectros de varrimento da percentagem de luz transmitida através do filme entre os comprimentos de onda de 190-900 nm estão dispostos na Figura 6.9. Como pode ser observado, tanto a incorporação do OEG quanto da MMTNa reduziram a transparência dos filmes. Elevada barreira à luz UV (comprimentos de onda inferiores aos 350 nm) é desejável em materiais de embalagens alimentares uma vez que podem ser aplicados na preservação de processos oxidativos. No entanto, nos comprimentos de onda da luz visível, quanto maior a opacidade do material pior é a sua aceitação por parte do consumidor (que sempre procura películas transparentes capazes de expor o produto embalado) (Peng e Li, 2014), desta forma os filmes produzidos têm esta desvantagem do ponto de vista visual, apesar do aspeto positivo da maior proteção do alimento embalado. A incorporação da MMTNa contribuiu para aumentar ainda mais a opacidade dos filmes, especialmente na região da luz visível, tendo desempenhado desta forma um papel antagonista do ponto de vista da aceitação dos novos materiais desenvolvidos.

6.1.8. Solubilidade em água, índice de intumescimento e ângulo de contato

A solubilidade em água dos filmes de quitosano foi afetada pelos dois fatores avaliados (incorporação do OEG e MMTNa) (Tabela 6.4). Sem incorporação da argila, apenas os filmes adicionados de 1% de OEG apresentaram menor valor de solubilidade em água ($p < 0,05$) em comparação com o filme controlo, já para os filmes onde o óleo e a montmorilonite foram incorporados, apenas para a maior concentração do OEG foi observado um aumento significativo neste parâmetro ($p < 0,05$). De um modo geral, a MMTNa quando associada ao OEG contribuiu para um aumento na solubilidade em água dos filmes, enquanto que nos filmes com OEG mas sem adição da argila foi observada uma tendência para a diminuição deste parâmetro. Resultado semelhante ao discutido para os filmes com incorporação de OEA no capítulo 5.

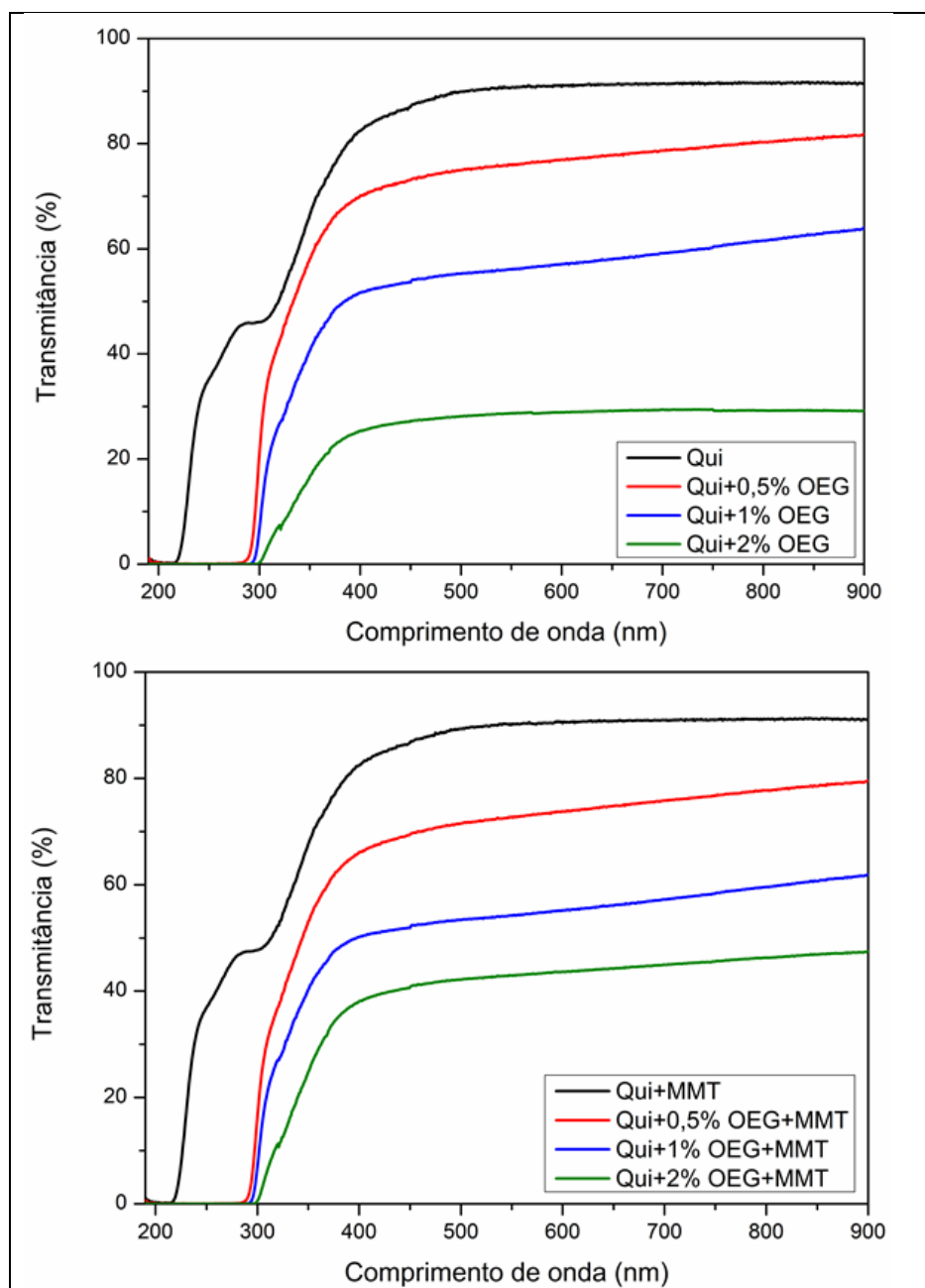


Figura 6.9. Transparência dos bionacompostos. Qui (quitosano); OEG (óleo essencial de gengibre); MMT (montmorilonite sódica).

Em relação à capacidade dos filmes em absorver água, a incorporação do OEG resultou na diminuição do índice de intumescimento ($p < 0,05$). A adição da montmorilonite reforçou ainda mais o efeito de redução da capacidade de absorver água dos filmes. A formação de ligações cruzadas entre os compostos ativos do OEG e o quitosano, assim como a boa interação da montmorilonite sódica com o quitosano (devido a conformação intercalada alcançada) e o OEG são responsáveis pela diminuição da capacidade dos filmes em absorver água. As

interações químicas criadas na matriz polimérica bloqueiam os grupos reativos do quitosano para reagirem com a água, diminuindo a sua capacidade em absorvê-la. (Abdollahi *et al.*, 2012a; Lavorgna *et al.*, 2010; Silva-Weiss *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2017).

Tabela 6.4. Índice de intumescimento, solubilidade em água e ângulo de contato dos bio-nano-compósitos.

OEG (%)**	Solubilidade em água (%)		Índice intumescimento (%)		Ângulo de contato (graus)	
	0% MMTNa	2,5% MMTNa	0% MMTNa	2,5% MMTNa	0% MMTNa	2,5% MMTNa
0	23,1±1,6 ^{Aa}	20,4±0,6 ^{Bb}	132,3±10,0 ^{Ab*}	192,2±13,3 ^{Aa}	70,9±4,0 ^{Ab}	90,6±5,5 ^{Aa}
0,5	20,3±0,4 ^{Ab}	21,9±0,6 ^{Ba}	124,6±3,5 ^{Aa}	35,1±20,7 ^{Cb}	70,3±7,5 ^{Aa}	68,6±1,6 ^{Ba}
1,0	16,4±0,4 ^{Bb}	18,7±0,2 ^{Ba}	97,8±18,2 ^{Ba}	97,0±13,4 ^{Ba}	66,6±5,5 ^{Aa}	70,9±3,2 ^{Ba}
2,0	19,6±2,1 ^{ABa}	23,5±2,4 ^{Aa}	87,0±2,5 ^{Ba}	54,7±20,5 ^{BCa}	57,2±1,9 ^{Ba}	63,8±7,6 ^{Ba}

* (A-D): Entre cada parâmetro, médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p<0,05$); (a-b): Entre cada parâmetro, médias na mesma linha seguidas por diferentes letras diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p<0,05$).

**Montmorilonite sódica (MMTNa); óleo essencial de gengibre (OEG).

Foi observada uma tendência de aumento da hidrofiliabilidade da superfície dos filmes com a incorporação do OEG, apesar desta diferença só ter tido significância estatística para os filmes incorporados com a maior concentração de OEG (2%) ($p<0,05$). Nos filmes incorporados com OEG e MMTNa também foi observado esta diminuição no ângulo de contato. Estes resultados indicam a presença de substâncias de caráter hidrofílico na superfície dos filmes, provavelmente compostos fenólicos do OEG (Contini *et al.*, 2011).

6.2. Avaliação “in vitro” das propriedades ativas dos filmes

6.2.1. Atividade antimicrobiana – teste difusão em agar

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de gengibre e dos filmes foi determinada pelo teste de difusão em agar está ilustrada na Figura 6.10. Tanto o óleo quanto os filmes apresentaram atividade apenas contra três bactérias gram-positivas (*B. cereus*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*) e a levedura testada (*C. albicans*). Desta forma, em comparação com o óleo essencial de alecrim (Capítulo 5), o OEG possui um espectro de ação menor, e por consequência, a atividade antimicrobiana dos filmes incorporados com estes óleos segue o mesmo comportamento.

Os óleos essenciais têm sido objetivo de muitos estudos, sendo à sua atividade antimicrobiana reconhecida contra uma vasta gama de microrganismos (López, Sánchez, Batlle, e Nerín, 2005; Regnier *et al.*, 2012; Ribeiro-Santos, Andrade, *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2013; Teixeira *et al.*, 2013).

O gengibre é uma especiaria obtida a partir dos rizomas de *Zingiber officinale* (Rosc.), da família *Zingiberaceae*, tipicamente consumida como uma pasta fresca, em fatias, em doces, como pó seco ou como aromatizantes na culinária ou chá (infusões) (El-Ghorab *et al.*, 2010). Óleos essenciais e oleorresinas extraídos da espécie *Z. officinale* são ricos em diversos compostos químicos, tais como zingibereno, α -curcumeno, canfeno, geranial, linalol, 1,8-cineol, que lhes conferem bioatividade como antioxidantes, anti-inflamatórios ou antimicrobianos (López *et al.*, 2017).

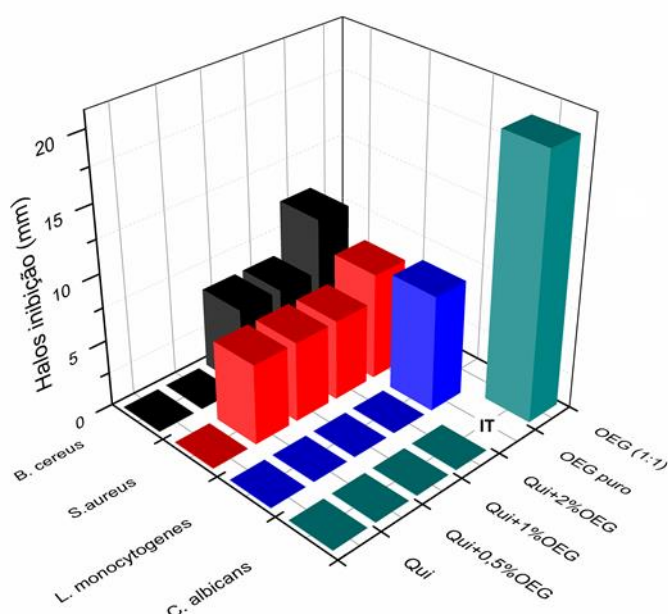


Figura 6.10. Atividade antimicrobiana (teste difusão em agar).
Qui: Quitosano; OEG: óleo essencial de gengibre; IT: Inibição total.

Neste estudo, o OEG puro demonstrou atividade antimicrobiana somente contra as bactérias patogênicas gram-positivas (*B. cereus*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*), não tendo sido observada nenhuma zona de inibição para *E. faecalis* ou para as bactérias gram-negativas testadas. Em relação à levedura (*C. albicans*), o óleo puro resultou em uma completa inibição do crescimento do fungo, e quando diluído (1:1) em DMSO uma zona de inibição de aproximadamente 20

mm foi registada (Fig. 6.10). Estes resultados estão de acordo com os relatados anteriormente em literatura para dois óleos essenciais de gengibre extraídos de diferentes partes da planta (das folhas ou dos rizomas) (Sivasothy *et al.*, 2011). Neste estudo, os OEGs exibiram em geral melhor atividade antibacteriana contra as bactérias gram-positivas do que as bactérias gram-negativas, provavelmente devido à proteção conferida pela camada de lipopolissacáridos da membrana exterior das bactérias gram-negativas (Shariatnia e Fazli, 2015). Singh e colaboradores (2008) reportaram boa atividade antifúngica (redução média de 60% do crescimento do micélio) de OEG contra *Aspergillus spp.* e *Fusarium moniliforme*, corroborando os excelentes resultados apresentados pelo OEG contra a *C. albicans*.

Acredita-se que a atividade antimicrobiana de plantas e especiarias é devida ao seu rico teor em compostos fenólicos (Ribeiro-Santos, Andrade, *et al.*, 2017; G. Singh *et al.*, 2008). A maior suscetibilidade à ação dos OEs das bactérias gram-positivas do que das gram-negativas sugere que o alvo destes compostos ativos seja a parede celular dos microrganismos (López *et al.*, 2017). Diferentes autores estudaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de gengibre, e obtiveram diferentes resultados (López *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2008; Trajano, Lima, Leite, e Travassos, 2009), alguns contrários e outros similares aos aqui reportados. Trajano e colaboradores (2009) apenas observaram atividade antimicrobiana do OEG contra *S. aureus*, não tendo sido reportada qualquer atividade contra *L. monocytogens*, *E. coli*, *B. cereus*, *S. enterica*, *P. aeruginosa* e *Yersinia enterocolitica*. Por outro lado, Singh *et. al* (2008) verificaram bons resultados para OEG contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, o que também foi observado por López *et. al* (2017). Esta diferença nos resultados deve estar atribuída às diferentes composições em termos de compostos fenólicos dos OEGs utilizados nos diferentes trabalhos, visto que a concentração e o tipo dos compostos fenólicos está diretamente relacionado com sua atividade antimicrobiana (Sivasothy *et al.*, 2011). Adicionalmente, o processo de extração dos OEs também pode interferir na medida que é determinante na composição final dos OEGs.

Em relação aos filmes, a sua atividade antimicrobiana foi observada apenas sob os discos dos filmes incorporados com 1% e 2% de OEG contra as bactérias *B. cereus* ou com 0,5%, 1% e 2% de OEG para o *S. aureus* (Fig. 6.10). Não foi observada nenhuma atividade contra as demais bactérias gram-positivas testadas, ou para nenhuma das bactérias gram-negativas ou levedura. Não houve diferença nos resultados dos filmes incorporados ou não com a MMTNa.

Apesar da reconhecida atividade antimicrobiana do quitosano, os filmes de quitosano puro (controle) ou incorporados com MMTNa, não apresentaram qualquer zona de inibição contra nenhum dos microrganismos testados. Segundo Hafsa *et. al* (2016) as propriedades antimicrobianas do quitosano tornam-se impercetíveis quando o polissacárido se encontra na forma de filmes insolúveis. Resultados similares foram observados em filmes de quitosano incorporados com extratos de própolis que apresentaram atividade antimicrobiana contra uma gama de bactérias tanto gram-negativas quanto gram-positivas, mas apenas sob os discos dos filmes que foram produzidos com a incorporação do própolis, nenhuma atividade foi reportada para os filmes controle de quitosano (Siripatrawan e Vitchayakitti, 2016).

O óleo essencial do gengibre quando incorporado nos filmes teve sua atividade antimicrobiana reduzida provavelmente devido a uma perda parcial dos compostos voláteis do óleo essencial por evaporação (Abdollahi *et al.*, 2012b) e à boa interação entre os compostos fenólicos e o quitosano que aprisionou os compostos ativos dentro da cadeia polimérica, reduzindo a sua difusão para o agar e, consequentemente limitando a sua atividade apenas à região sob os discos dos filmes (Siripatrawan e Vitchayakitti, 2016).

6.2.2. Atividade antimicrobiana – contagem de células viáveis

A atividade antimicrobiana dos filmes foi também estudada de forma quantitativa pelo método de contagem de células viáveis contra duas bactérias patogénicas, veiculadas por alimentos, uma gram-positiva (*B. cereus*) e uma gram-negativa (*S. enterica*). Os resultados dos ensaios antimicrobianos para o filme em contato direto com o meio de cultura inoculado com as bactérias foram mais promissores (Tabela 6.5). As reduções máximas atingidas contra a bactéria

gram-positiva (*B. cereus*) e a gram-negativa (*S. enterica*) foram de respectivamente 7,3 e 5,3 reduções logarítmicas após as 24 horas de contato entre os filmes de quitosano puro (controle). Mais uma vez, uma maior atividade foi encontrada contra as bactérias gram-positivas do que contra as gram-negativas, corroborando os resultados apresentados no teste de difusão em agar. Em comparação com os filmes incorporados com OEG e/ou a MMTNa, houve uma redução na diminuição do número de células viáveis com a incorporação dos extratos ativos ou do nanorreforço ($p < 0.05$), exceto para os filmes Qui + MMTNa ou Qui + MMTNa + 2% OEG ($p > 0.05$). Apesar desta não significância estatística, a diminuição do número de células viáveis para estes filmes foi menor que a diminuição apresentada pelo filme controle contra ambas as bactérias testadas. Desta forma, a atividade antimicrobiana dos filmes é provavelmente devida à própria atividade antimicrobiana intrínseca do quitosano, e não devido ao OEG ou à MMT adicionados.

Tabela 6.5. Resultado dos ensaios de atividade antimicrobiana “in vitro” e do ensaio de migração dos filmes incorporados com MMTNa e/ou OEG.

Filme	Atividade antibacteriana (reduções logarítmicas)		Coeficiente de Difusão ($10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$)	Máximo difundido / total incorporado	Máxima % sequestro radical (DPPH)
	<i>B. cereus</i>	<i>S. enterica</i>			
Qui	7,3±0,1 ^{A*}	5,3±0,6 ^{A*}	-	-	-
Qui+MMTNa	6,7±1,0 ^A	3,6±0,7 ^B	-	-	-
Qui+0.5%OEG	3,4±0,2 ^B	3,8±0,1 ^B	2,06±0,2 ^{4B}	0,71	6,3
Qui+MMTNa+0.5%OEG	2,3±0,1 ^B	3,2±1,0 ^B	3,77±0,48 ^{AB}	0,82	40,6
Qui+1%OEG	1,5±0,3 ^B	3,8±0,4 ^B	3,15±0,29 ^{AB}	0,68	10,5
Qui+MMTNa+1%OEG	3,6±0,8 ^B	3,2±0,3 ^B	11,4±0,63 ^A	1,0	8,32
Qui+2%OEG	3,6±0,3 ^B	3,6±0,3 ^B	1,24±0,43 ^B	0,37	18,9
Qui+MMTNa+2%OEG	5,3±0,0 ^A	2,3±0,2 ^B	0,13±0,01 ^B	0,31	6,05

*(A-B): médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p > 0.05$).

** OEG: Óleo essencial de gengibre; Qui: Quitosano; MMTNa: Montmorilonite sódica.

O mecanismo de ação antimicrobiana do quitosano está relacionado com as suas cargas positivas (NH_3^+) que interferem com os resíduos de carga negativa das macromoléculas componentes da superfície da célula microbiana, causando permeabilização e vazamento do material intracelular, e resultando na morte celular (Dutta *et al.*, 2009; Siripatrawan e Harte, 2010; Verlee *et al.*, 2017).

A interação entre a montmorilonite e os compostos fenólicos do OEG com o grupo amina do quitosano (Lavorgna *et al.*, 2010; Siripatrawan e Harte, 2010) provavelmente reduziram o número de grupos funcionais (NH_3^+) para interagir com a membrana celular dos microrganismos e expressar a atividade antimicrobiana.

Em comparação com os filmes incorporados com OEA, os filmes adicionados de OEG apresentaram menor atividade antimicrobiana também pelo método de contagem de células viáveis.

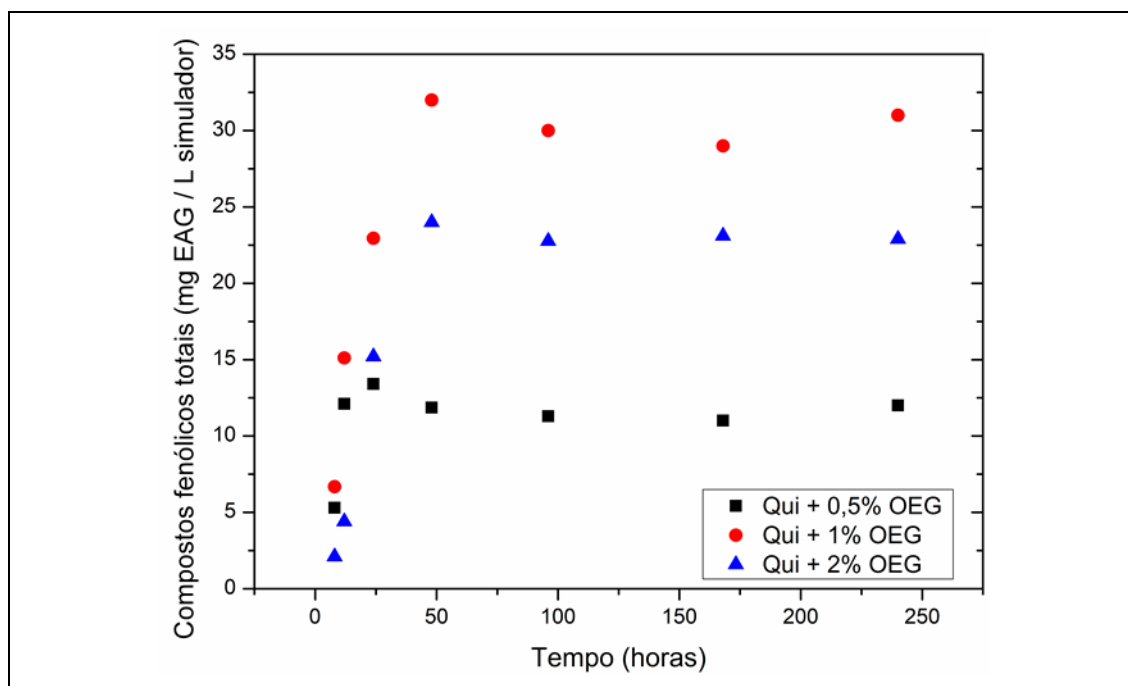
6.2.3. Migração de compostos fenólicos totais

Os coeficientes de difusão, razões máximas de CFT libertados / incorporados e percentuais máximos de sequestro do radical DPPH (poder antioxidante dos compostos presentes no simulador alimentar após a migração) estão dispostos na Tabela 6.5.

A liberação de compostos fenólicos para o etanol 95% apresentou o padrão de "crescimento exponencial até um máximo", tendo atingido o equilíbrio entre 24-48 h após contato o meio simulador (Fig. 6.11). Comportamento semelhante foi reportado para a migração dos compostos fenólicos presentes em extrato de chá verde incorporados em EVOH, também utilizando o etanol 95% como simulador alimentar (Lopez de Dicastillo *et al.*, 2011) ou de extrato de cacau incorporado também em filmes de EVOH porém utilizando como simulador a água (Calatayud *et al.*, 2013).

Os coeficientes de difusão não diferiram estatisticamente entre os bio-nanocompósitos testados ($p>0,05$), exceto para o filme de quitosano + MMTNa + 1% OEG, que mostrou um coeficiente de difusão significativamente maior do que aqueles obtidos com as duas amostras incorporadas com 2% OEG ($p<0,05$) (Tabela 6.5). Ou seja, os filmes incorporados com 1% de OEG e MMTNa apresentaram a liberação mais rápida de CFT para o simulador. Também é importante salientar que a presença da nanoargila acelerou o processo de difusão quando 0,5% ou 1% de OEG foi adicionado, e diminuiu a velocidade quando 2% de OEG foi adicionado.

Em sistemas alimentares, a grande vantagem das embalagens ativas é a possibilidade de extensão do tempo de proteção do alimento por meio liberação gradual dos compostos bioativos (Bolumar *et al.*, 2011). Consequentemente, entre os filmes produzidos, baseando-se no ensaio de migração, as películas com adição da MMTNa e 2% de OEG podem ser destacadas como aquelas com maior potencial para utilização na preservação dos alimentos (libertação mais lenta – maior tempo de proteção). No entanto, em comparação com outros valores de coeficiente de difusão para os filmes de quitosano incorporados com OEA (apresentados no capítulo 5), estes resultados possuem uma ordem de magnitude superior, ou seja, uma liberação mais rápida dos compostos ativos da película para o simulador/alimento.



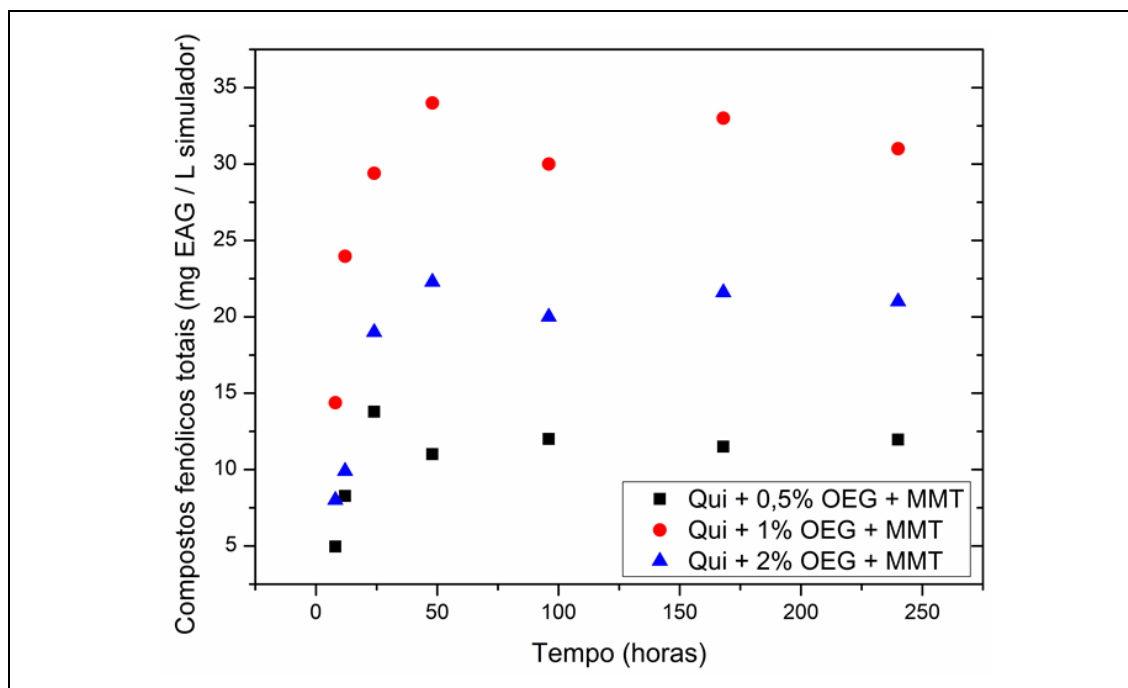


Figura 6.11. Migração dos compostos fenólicos totais dos filmes ativos para o simulador. Qui: Quitosano; OEG: óleo essencial de gengibre; MMT: montmorilonite sódica.

Os compostos fenólicos mantiveram parte de sua atividade antioxidante, porém esta não apresentou correlação com o teor de compostos fenólicos presentes no simulado, como usualmente é reportado na literatura (Souza, Rodrigues, *et al.*, 2018). Abdollahi e colaboradores (2012a) relataram a formação de interações entre os grupos funcionais do quitosano e os compostos fenólicos presentes no óleo essencial de alecrim, adicionalmente, com a incorporação de MMTNa estas ligações foram ainda reforçadas. Estas interações entre o quitosano e os compostos fenólicos, e o quitosano x os compostos fenólicos x a MMTNa pode também ter ocorrido nos nossos filmes (corrobora os resultados de FT-IR e DRX), podendo ser uma possível explicação para a mudança da sua atividade antioxidante. Estudos “in vitro” são importantes para avaliar a atividade de novos materiais, uma vez que prevêem o comportamento em situação real. No entanto, o alimento é uma matriz muito mais complexa do que o simulador, e desta forma, no cenário real, os resultados podem ser diferentes (Souza, Rodrigues, *et al.*, 2018). Assim, a investigação da atividade “in situ” dos filmes adquire uma elevada relevância.

6.3. Avaliação “in situ” dos filmes – estudo da vida de prateleira de carne fresca de frango

A carne de frango é considerada um alimento saudável, rico em proteínas de alto valor biológico, vitaminas e minerais, além de possuir baixo teor em gordura, dos quais grande parte são ácidos gordos poliinsaturados (OECD-FAO, 2016). Devido à sua composição intrínseca (i.e. elevado teor de proteínas, humidade e teor de ácidos gordos insaturados) e pH elevado, o desenvolvimento de reações oxidativas assim como o crescimento de microrganismos é favorecido, o que torna esse alimento um produto altamente perecível (Latou *et al.*, 2014; Petrou *et al.*, 2012). As perdas devido a esta perecibilidade são altas, e esta indústria alimentar está em constante procura de novas tecnologias/métodos para aumentar a vida útil e a segurança/qualidade global dos seus produtos (Petrou *et al.*, 2012).

As embalagens ativas à base de polímeros biodegradáveis e incorporadas com extratos naturais têm despertado grande interesse para aumentar a vida de prateleira de produtos alimentares (Arkoun, Daigle, Holley, Heuzey, e Ajji, 2018). Por meio desta tecnologia a indústria é capaz de reduzir a deterioração dos alimentos, aumentar a segurança alimentar, fornecer um alimento menos modificado por aditivos sintéticos, ou seja, mais natural, ao mesmo tempo que contribui para reduzir o problema ambiental criado devido ao aumento contínuo do uso de materiais plásticos à base de petróleo (não biodegradáveis, que persistem no ambiente por centenas de anos sem se degradar) (Souza e Fernando, 2016).

Desta forma, os filmes de quitosano incorporados ou não com a MMTNa e o óleo essencial de gengibre em diferentes concentrações foram utilizados como embalagens primárias de carne de frango fresca picada, e a seguir estão os resultados do acompanhamento da vida de prateleira destes produtos.

6.3.1. Caracterização físico-química

Para avaliar o poder protetor dos filmes na extensão da vida útil da carne de frango fresca, alguns parâmetros físico-químicos (pH, acidez, cor e

humidade) foram determinados ao longo de 15 dias de armazenamento sob refrigeração (Tabela 6.6).

O processo natural de deterioração da carne resulta no aumento do pH (com redução da acidez), mudanças na cor (processo de descoloração) e aumento na humidade como pode ser observado no tratamento controlo (carne sem qualquer proteção – cenário de máxima deterioração) (Tabela 6.6). Estas mudanças ocorreram de forma menos significativa para as outras amostras protegidas por alguma película.

As carnes protegidas pela película aderente comercial, apesar de terem apresentado menores alterações do que o alimento sem filme, em comparação com as amostras protegidas pelo filme de quitosano registaram maiores sinais de deterioração, o que indica que os bio-nanocompósitos produzidos têm potencial para serem substitutos das películas plásticas comerciais como uma alternativa mais sustentável.

A incorporação do OEG no quitosano aumentou significativamente a atividade protetora dos filmes, e as carnes protegidas nestes tratamentos apresentaram alterações mínimas ao longo do tempo. A magnitude das mudanças observadas nas amostras envolvidas nos biopolímeros com incorporação de MMTNa, com ou sem OEG, foi no intermédio entre as carnes revestidas com o filme controlo (quitosano puro) e os filmes quitosano + OEG.

A evolução da cor foi determinada por meio do cálculo do ângulo de hue das amostras de carne (Tabela 6.6). Este parâmetro relaciona as coordenadas CIELab, dando valores em ângulos que representam a tonalidade dos material mensurado, variando de 0° a 360° onde 0° representa o vermelho, 90° o amarelo, 180° o verde e 270° o azul (MINOLTA, 2007).

Tabela 6.6. Estudo da vida de prateleira de carne fresca de frango – parâmetros físico-químicos.

	Dia	Sem filme	PVC	Qui	Qui+ 0,5%OEG	Qui+ 1%OEG	Qui+ 2%OEG	Qui+ MMTNa	Qui+MMTNa+ 0,5%OEG	Qui+MMTNa+ 1%OEG	Qui+MMTNa+ 2%OEG
hue* (graus)	0	57±1 ^{aE}	57±1 ^{aC}	57±1 ^{aA}	57±1 ^{aB}	57±1 ^{aA}	57±1 ^{aA}	57±1 ^{aA}	57±1 ^{aA}	57±1 ^{aB}	57±1 ^{aBC}
	3	62±0 ^{abD}	61±1 ^{abcB}	59±2 ^{bcdA}	56±1 ^{deB}	52±1 ^{eA}	53±1 ^{eB}	62±0 ^{abA}	60±2 ^{abcA}	58±1 ^{cdB}	62±0 ^{aA}
	7	64±0 ^{abC}	67±0 ^{aA}	59±1 ^{bcA}	56±1 ^{cdB}	57±4 ^{cdA}	57±2 ^{cdA}	62±3 ^{bcA}	59±1 ^{bcA}	64±0 ^{abA}	53±2 ^{dC}
	10	67±0 ^{aB}	66±1 ^{aA}	59±1 ^{cA}	64±1 ^{abA}	58±2 ^{cA}	60±1 ^{bcA}	61±2 ^{bcA}	59±1 ^{cA}	60±0 ^{bcB}	61±2 ^{bcAB}
	15	70±1 ^{aA}	67±1 ^{abA}	60±2 ^{cdA}	55±0 ^{eB}	55±2 ^{eA}	57±1 ^{deA}	62±0 ^{bcA}	60±0 ^{cdA}	57±4 ^{cdeB}	60±3 ^{cdeAB}
pH	0	5,87±0,11 ^{aC}	5,96±0,15 ^{aC}	5,87±0,11 ^{aD}	5,72±0,02 ^{aAB}	5,71±0,21 ^{aA}	5,71±0,21 ^{aBC}	5,96±0,15 ^{aB}	5,96±0,15 ^{aA}	5,96±0,15 ^{aB}	5,96±0,15 ^{aB}
	3	6,09±0,35 ^{aC}	6,19±0,08 ^{aC}	6,01±0,20 ^{aCD}	5,57±0,07 ^{bB}	5,38±0,02 ^{bB}	5,45±0,05 ^{bC}	6,01±0,00 ^{aB}	6,12±0,05 ^{aA}	6,03±0,02 ^{aB}	5,96±0,09 ^{abB}
	7	7,16±0,30 ^{aB}	6,50±0,12 ^{bB}	6,33±0,02 ^{bcBC}	5,62±0,01 ^{fAB}	5,74±0,04 ^{efA}	5,76±0,10 ^{efB}	5,84±0,02 ^{dfB}	6,02±0,04 ^{cdeA}	6,10±0,04 ^{cdB}	5,94±0,08 ^{defB}
	10	7,55±0,02 ^{aB}	6,79±0,04 ^{bB}	6,51±0,21 ^{bcB}	5,58±0,02 ^{eB}	5,60±0,03 ^{eAB}	5,52±0,04 ^{eBC}	6,01±0,04 ^{dB}	6,14±0,20 ^{dA}	6,29±0,07 ^{cdB}	6,00±0,20 ^{dB}
	15	8,17±0,14 ^{aA}	7,26±0,13 ^{bcA}	7,14±0,23 ^{bcA}	5,85±0,2 ^{deA}	5,71±0,09 ^{eA}	6,22±0,01 ^{deA}	7,27±0,36 ^{bcA}	6,50±0,55 ^{cdeA}	7,33±0,36 ^{bA}	6,61±0,24 ^{bcdA}
Acidez titulável (g/100g de ácido oleico)	0	1,80±0,39 ^{aA}	1,68±0,22 ^{aA}	1,80±0,39 ^{aA}	2,12±0,11 ^{aA}	2,12±0,11 ^{aA}	2,12±0,11 ^{aA}	1,68±0,22 ^{aA}	1,68±0,22 ^{aA}	1,68±0,22 ^{aA}	1,68±0,22 ^{aA}
	3	1,24±0,37 ^{bAB}	1,32±0,08 ^{bB}	1,13±0,01 ^{bB}	1,70±0,02 ^{aB}	1,75±0,08 ^{aB}	1,75±0,03 ^{aB}	1,19±0,17 ^{bB}	1,04±0,19 ^{bB}	1,04±0,09 ^{bCD}	1,26±0,05 ^{bAB}
	7	0,42±0,14 ^{fC}	1,27±0,07 ^{cdB}	0,85±0,05 ^{eB}	1,47±0,01 ^{abBC}	1,55±0,04 ^{aC}	1,41±0,03 ^{abcC}	1,49±0,00 ^{abAB}	1,22±0,00 ^{cdAB}	1,33±0,13 ^{bcdBC}	1,16±0,02 ^{dB}
	10	0,73±0,15 ^{cBC}	1,15±0,06 ^{bBC}	1,13±0,18 ^{bcB}	1,30±0,20 ^{abC}	1,46±0,09 ^{abC}	1,36±0,04 ^{abC}	1,46±0,10 ^{abAB}	1,58±0,23 ^{aAB}	1,52±0,06 ^{abAB}	1,65±0,15 ^{aA}
	15	0,66±0,14 ^{bBC}	0,87±0,02 ^{abC}	1,22±0,30 ^{aAB}	0,73±0,11 ^{abD}	1,22±0,03 ^{aD}	1,11±0,08 ^{abD}	0,78±0,15 ^{abC}	1,24±0,34 ^{aAB}	0,76±0,09 ^{abD}	1,13±0,29 ^{abB}
Humidade (%)	0	75,5±0,2 ^{aB}	75,5±0,2 ^{aB}	75,5±0,2 ^{aA}	75,5±0,2 ^{aA}	75,5±0,2 ^{aA}	75,5±0,2 ^{aA}	75,5±0,2 ^{aA}	75,5±0,2 ^{aA}	75,5±0,2 ^{aA}	75,5±0,2 ^{aA}
	3	75,4±0,2 ^{abB}	75,8±0,4 ^{aB}	73,4±0,1 ^{cBC}	74,7±0,4 ^{bA}	73,3±0,0 ^{cAB}	73,6±0,2 ^{cB}	73,8±0,2 ^{cB}	73,1±0,4 ^{cB}	73,4±0,2 ^{cB}	73,0±0,2 ^{cC}
	7	76,0±0,2 ^{aAB}	75,1±0,4 ^{aB}	72,5±0,1 ^{bC}	73,2±0,3 ^{bB}	72,6±0,6 ^{bB}	72,8±0,5 ^{bBC}	73,2±0,3 ^{bB}	73,1±0,3 ^{bB}	72,8±0,0 ^{bB}	72,9±0,7 ^{bC}
	10	76,2±0,4 ^{aAB}	75,6±0,3 ^{abB}	74,5±0,3 ^{bcAB}	74,4±0,5 ^{cAB}	72,0±0,1 ^{dB}	70,7±0,7 ^{eCD}	73,6±0,2 ^{cB}	74,1±0,2 ^{cB}	73,4±0,6 ^{cB}	74,1±0,2 ^{cB}
	15	77,3±1,0 ^{aA}	76,7±0,1 ^{abA}	73,4±0,8 ^{cdeBC}	71,6±0,8 ^{eC}	72,0±2,0 ^{deB}	71,3±0,4 ^{eD}	75,9±0,6 ^{abcA}	74,2±0,9 ^{bcdB}	74,8±0,2 ^{abcA}	73,6±0,2 ^{cdeBC}

* (A-D): Para cada parâmetro, médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$); (a-f): Para cada parâmetro, médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).

** OEG: Óleo essencial de gengibre; Qui: Quitosano; MMTNa: Montmorilonite sódica; PVC: cloreto de polivinilo.

O valor inicial observado para este parâmetro foi de 57°, ou seja, coloração avermelhada, ao longo do tempo houve um aumento deste valor, especialmente para as amostras que não foram protegidas ou as embaladas no PVC. Maiores valores de hue* indicam que a cor da carne está tendendo para tons mais amarelos, ou seja, perdendo a coloração avermelhada característica dos produtos frescos. Entre as amostras que foram protegidas com algum tipo de película (seja a comercial ou a biodegradável desenvolvida), as carnes embaladas no PVC e nos filmes controlo (quitosano puro) apresentaram os maiores valores hue* no último dia de análise ($p < 0,05$). Já entre os filmes ativos incorporados com o OEG, independente do conteúdo do óleo adicionado, os valores do ângulo de hue não variaram estatisticamente ao longo do tempo ($p > 0,05$) permanecendo entre 55° a 60° (Tabela 6.6). Os filmes de quitosano puro e quitosano + MMTNa também foram responsáveis pela redução da descoloração da carne, e para todas as amostras protegidas pelos filmes ativos (independentemente da incorporação do OEG ou MMT) a coloração das mesmas foi estatisticamente igual nos tempos zero e quinze dias de armazenamento ($p > 0,05$).

Desta forma, os bio-nanocompósitos foram eficazes na preservação da coloração inicial da carne de frango fresca picada, o que é um fator decisivo no processo de aceitação e compra deste tipo de produtos visto que este é um atributo sensorial muito valorizado pelos consumidores no ato da decisão de compra (interfere na aceitação ou rejeição de alimentos) (Rojas e Brewer, 2008).

A redução da coloração vermelha das carnes está diretamente relacionada aos processos de oxidação dos ácidos gordos e à degradação do grupo hemo com produção da meta-mioglobina (Contini *et al.*, 2014; Ghaderi-Ghahfarokhi *et al.*, 2017; Melo *et al.*, 2012). Os filmes de quitosano desenvolvidos demonstraram ser eficazes ferramentas na preservação da coloração da carne podendo ter agido por duas possíveis rotas, nomeadamente: através do poder antioxidante dos compostos presentes no OEG que retardaram a oxidação lipídica, ou através da capacidade quelante do quitosano que ao sequestrar iões metálicos pode diminuir a velocidade da deterioração (Abdollahi *et al.*, 2014; Melo *et al.*, 2012). Estes resultados estão de acordo com o observado nas TBARS e estudo

microbiológico que estão discutidos nas secções a seguir. Comportamento similar foi também verificado para os filmes com a incorporação de OEA (capítulo 5).

Em relação ao pH, a carne que não recebeu qualquer proteção atingiu um valor de pH em torno dos 8,17 ao final dos 15 dias de armazenamento. Semelhante com o que aconteceu com a cor, o pH variou menos nas amostras protegidas pelas películas. No 15º dia, o menor valor de pH registado foi de 5,71 para a amostra protegida pelo filme quitosano + 1% OEG. As outras duas concentrações de OEG testadas nos filmes sem incorporação da nanoargila também foram capazes de manter os valores de pH baixos, não tendo ao final de 15 dias apresentado variação estatística em relação ao tempo inicial ($p > 0,05$), exceto para o Qui+2% OEG. Para todas as demais amostras o pH aumentou ao final dos 15 dias de armazenamento, mas entre as amostras não houve diferenças significativas ($p > 0,05$): amostras protegidas pelo PVC apresentaram valores de pH estatisticamente iguais aos das amostras protegidas pelos filmes Qui, Qui + MMTNa, ou Qui + MMTNa + OEG (independente da concentração do óleo).

A redução da atividade protetora dos filmes com a incorporação da montmorilonite provavelmente é devida à diminuição da migração dos compostos fenólicos, que reduz o efeito protetor do processo oxidativo e de desenvolvimento dos microrganismos, o que está de acordo com os demais resultados apresentados.

O aumento do valor de pH pode ser atribuído ao desenvolvimento das bactérias deterioradoras que ao produzirem compostos voláteis diminuem a acidez, logo aumentam o pH (Melo *et al.*, 2012). Resultados semelhantes são reportados na literatura para filetes de peixe embalados em filmes de quitosano incorporados com OEA (Abdollahi *et al.*, 2014), assim como envolvidos em películas de quitosano incorporadas com OEG (Remya *et al.*, 2016). A acidez titulável por sua vez apresentou comportamento contrário, ou seja, reduziu ao longo do tempo, corroborando os resultados observados para o pH. Este comportamento foi semelhante ao observado também para as carnes protegidas com os filmes de quitosano incorporados com OEA discutidos no capítulo anterior.

A humidade das amostras embaladas nos filmes de quitosano apresentou uma tendência para a manutenção ou redução dos valores (Tabela 6.6), especialmente para as amostras embaladas nos filmes incorporados com OEG sem MMTNa ($p < 0,05$). Este comportamento pode ser atribuído ao carácter hidrofílico do quitosano que lhe confere a capacidade de absorver elevados teores de água (Souza *et al.*, 2017, Pires, Souza e Fernando, 2018), como foi apresentado nos dados de índice de intumescimento, os filmes com menores capacidades de absorver água (Qui+1% e 2% OEG + MMTNa) foram os que apresentaram os maiores valores de humidade entre as amostras embaladas nos biopolímeros incorporadas com OEG. Mais uma vez este comportamento foi semelhante ao observado para as amostras embaladas nos filmes com incorporação de OEA discutidas no capítulo 5.

6.3.2. Determinação das TBARS

O grau de oxidação das carnes foi determinado por meio da determinação do índice TBARS (Tabela 6.7). O teor de produtos secundários da oxidação dos ácidos gordos aumentou ao longo do tempo para todos os tratamentos ($p < 0,05$) exceto para a carne embalada nos filmes de quitosano incorporados com OEG nas concentrações 0,5%, 1% ou 2% sem adição da MMTNa ($p > 0,05$).

A presença da nanoargila diminuiu o efeito protetor dos filmes, provavelmente devido à boa interação entre o quitosano, a montmorilonite e os compostos fenólicos que foram capazes de formar uma rede que diminuiu a libertação dos compostos ativos da matriz polimérica para o alimento. Assim, uma maior oxidação foi observada nas amostras embaladas nestes tratamentos, apesar da proteção conferida quando comparada com as amostras sem filme ou envolvidas no PVC.

Tabela 6.7. Estudo da vida de prateleira de carne fresca de frango – qualidade microbiológica e oxidação lipídica.

Parâmetros	Dia	Sem filme*	PVC	Qui	Qui+ 0,5%OEG	Qui+ 1%OEG	Qui+ 2%OEG	Qui+ MMTNa	Qui + MMTNa + 0,5%OEG	Qui + MMTNa + 1%OEG	Qui + MMTNa + 2%OEG
TBARS (mg MDA/ kg carne)	0	0.11±0.05 ^{aC}	0.11±0.05 ^{aB}	0.11±0.05 ^{aB}	0.11±0.05 ^{aA}	0.11±0.05 ^{aA}	0.11±0.05 ^{aAB}	0.11±0.05 ^{aB}	0.11±0.05 ^{aC}	0.11±0.05 ^{aC}	0.11±0.05 ^{aB}
	3	0.13±0.06 ^{bC}	0.11±0.01 ^{bB}	0.19±0.06 ^{bB}	0.16±0.02 ^{bA}	0.07±0.0 ^{bB}	0.10±0.06 ^{bAB}	0.34±0.02 ^{aB}	0.15±0.01 ^{bC}	0.15±0.03 ^{bC}	0.18±0.09 ^{bB}
	7	0.88±0.20 ^{aB}	0.07±0.01 ^{cB}	0.12±0.02 ^{cB}	0.19±0.10 ^{cA}	0.05±0.02 ^{cB}	0.06±0.02 ^{cAB}	0.49±0.03 ^{bAB}	0.17±0.04 ^{cC}	0.16±0.02 ^{cC}	0.13±0.02 ^{cB}
	10	1.48±0.33 ^{aA}	0.65±0.25 ^{bcA}	0.23±0.06 ^{deAB}	0.20±0.02 ^{deA}	0.04±0.01 ^{eB}	0.02±0.01 ^{eB}	0.58±0.04 ^{bcdAB}	0.78±0.00 ^{bB}	0.57±0.00 ^{bcdB}	0.28±0.03 ^{cdeB}
	15	1.97±0.28 ^{aA}	0.65±0.02 ^{bcdA}	0.42±0.12 ^{cdA}	0.25±0.0 ^{cdA}	0.20±0.04 ^{dA}	0.15±0.06 ^{dA}	1.11±0.54 ^{bA}	1.09±0.20 ^{bA}	0.83±0.12 ^{bcA}	0.51±0.12 ^{bcdA}
Coliformes totais (Log NMP/g carne)	0	0.8±0.4 ^{aC}	0.8±0.4 ^{aC}	0.8±0.4 ^{aC}	0.8±0.4 ^{aB}	0.8±0.4 ^{aC}	0.8±0.4 ^{aB}	0.8±0.4 ^{aC}	0.8±0.4 ^{aC}	0.8±0.4 ^{aD}	0.8±0.4 ^{aC}
	3	3.0±0.4 ^{bcBC}	3.4±0.0 ^{abB}	2.8±0.5 ^{bcB}	3.2±0.2 ^{abcA}	4.0±0.0 ^{aA}	2.8±0.4 ^{bcA}	2.9±0.5 ^{bcB}	2.9±0.5 ^{bcB}	2.2±0.2 ^{cC}	2.2±0.2 ^{cB}
	7	4.5±1.7 ^{aAB}	3.9±0.5 ^{abcB}	4.0±0.9 ^{abAB}	3.4±0.3 ^{abcA}	2.3±0.00 ^{bcB}	2.1±0.1 ^{cA}	3.0±0.3 ^{abcB}	3.6±0.4 ^{abcB}	3.7±0.4 ^{abcB}	2.4±0.1 ^{bcB}
	10	6.7±0.6 ^{aA}	6.4±0.0 ^{aA}	5.3±1.0 ^{aA}	3.2±0.0 ^{bA}	2.6±0.6 ^{bB}	2.2±0.8 ^{bA}	5.9±0.2 ^{aA}	6.2±0.2 ^{aA}	5.9±0.5 ^{aA}	5.9±0.5 ^{aA}
MTV (Log UFC/g carne)	0	5.1±0.1 ^{aC}	5.1±0.1 ^{aC}	5.1±0.1 ^{aC}	5.1±0.1 ^{aC}	5.1±0.1 ^{aB}	5.1±0.1 ^{aB}	5.1±0.1 ^{aC}	5.1±0.1 ^{aC}	5.1±0.1 ^{aB}	5.1±0.1 ^{aB}
	3	8.8±0.1 ^{aB}	8.7±0.0 ^{aB}	7.1±0.3 ^{bB}	7.1±0.4 ^{bB}	6.7±0.2 ^{bA}	6.8±0.2 ^{bA}	6.7±0.0 ^{bB}	7.1±0.3 ^{bB}	5.3±0.2 ^{cB}	5.9±0.0 ^{cB}
	7	10.2±0.1 ^{aA}	9.5±0.3 ^{abA}	8.5±0.2 ^{cdA}	7.4±0.0 ^{efB}	7.8±0.1 ^{dfA}	8.1±0.1 ^{cdeA}	7.2±0.7 ^{fAB}	8.7±0.1 ^{bcA}	8.7±0.1 ^{cA}	8.3±0.2 ^{cdA}
	10	10.1±0.0 ^{aA}	9.6±0.1 ^{abA}	8.7±0.5 ^{cA}	8.3±0.2 ^{cdA}	7.5±0.1 ^{eA}	7.7±0.5 ^{deA}	8.5±0.0 ^{cA}	8.8±0.0 ^{cA}	8.9±0.1 ^{bcA}	8.8±0.0 ^{cA}

*(A-D): Para cada parâmetro, médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$); (a-g): Para cada parâmetro, médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).

** OEG: Óleo essencial de gengibre; Qui: Quitosano; MMTNa: Montmorilonite sódica; PVC: cloreto de polivinilo; MTV: microrganismos totais viáveis; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; NMP: número mais provável.

O desenvolvimento microbiano, juntamente com a oxidação dos ácidos gordos constituem os principais responsáveis pela deterioração dos alimentos (Remya *et al.*, 2016), sendo o limiar para percepção dos odores indesejáveis deste processo de deterioração referentes a um TBARS igual a 0,5 mg de MDA / kg de carne (Yang *et al.*, 2015).

Até o sétimo dia de armazenamento sob frio, apenas as carnes sem filme haviam excedido este valor de TBARS, e desta foram, já seriam consideradas rejeitadas pelos consumidores. No 10º dia de armazenamento os tratamentos envolvidos nas películas de PVC, Qui + MMTNa, Qui + MMTNa + 0,5% ou 1% de OEG atingiram este limite. Finalmente, ao final dos quinze dias de avaliação, as carnes protegidas nos filmes Qui + MMTNa + 2% OEG ultrapassaram esta marca, enquanto que todas as demais amostras envolvidas nos filmes de quitosano incorporados com OEG (0,5%, 1% ou 2%) sem incorporação da MMTNa ou no filme controlo (Qui) mantiveram os níveis de MDA inferiores aos 0,5 mg (permaneceram dentro dos parâmetros de aceitação pelo consumidor, do ponto de vista do cheiro). Estes resultados demonstram que os biofilmes têm potencial para estender a vida útil de carne de frango em pelo menos 8 dias utilizando-se os compósitos de quitosano com OEG.

O efeito protetor dos filmes provavelmente está relacionado com a boa barreira ao oxigénio e capacidade de capturar iões do quitosano (Abdollahi *et al.*, 2014), assim como com a capacidade extra dos compostos fenólicos presentes no OEG de atuarem com antioxidante, estabilizando os radicais livres (El-Ghorab *et al.*, 2010; Melo *et al.*, 2012). Outros biopolímeros incorporados com diferentes OEs apresentaram resultados semelhantes na conservação de diferentes alimentos (Abdollahi *et al.*, 2014; Atarés *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015).

6.3.3. Estudo da qualidade microbiológica das carnes

As mudanças na contagem total de microrganismos aeróbios viáveis, assim como dos coliformes totais das carnes sem filme, envolvidas no PVC ou nos filmes ativos estão dispostas na Tabela 6.7.

A carne apresentou no tempo zero uma contagem de microrganismos totais viáveis (MTV) igual a 5,1 log UFC/ g carne, abaixo dos 6,69 logs estabelecidos como limite no Regulamento (EC) nº 2073/2005 para carne picada (Rees, Doyle, & Taylor, 2017). Ao longo do tempo, esta contaminação aumentou para todos os tratamentos ($p<0,05$), tendo alcançado um valor máximo de 10,1 log UFC/g de carne para as carnes sem filme, enquanto que as amostras protegidas com os biopolímeros apresentaram uma redução desta contagem entre 1,1 a 2,6 logaritmos. Os filmes ativos foram capazes de reduzir em 0,5 log a contagem de MTV quando comparados com a película comercial, ou seja, uma vantagem em relação ao produto disponível no mercado.

Do ponto de vista sensorial, a carne com uma contaminação de MTV superior a 7 log UFC/g de carne é rejeitada pelos consumidores (Economou, Pournis, Ntzimani, e Savvaidis, 2009). Neste estudo, a carne de frango sem filme ou embalada na película comercial excederam este limite desde o terceiro dia de armazenamento sob frio, enquanto que as amostras protegidas pelos filmes ativos de quitosano estavam abaixo ou apenas um pouco acima deste valor (7,1 log UFC/g carne para os tratamentos Qui, Qui+0,5%OEG com ou sem MMTNa). A presença do OEG aumentou o poder antimicrobiano dos filmes de quitosano, enquanto que o MMT limitou o mesmo. Como discutido anteriormente, a presença da argila provavelmente interferiu no processo de difusão dos compostos ativos presentes no OEG para o alimento, além de ter bloqueado os grupos funcionais do quitosano para atuarem como agente antimicrobiano.

Resultados semelhantes foram observados em filetes de peito de frango embalados em filmes de caseinato de sódio incorporados com óleo essencial de gengibre (Noori, Zeynali, e Almasi, 2018). Os autores atribuíram a redução no crescimento microbiano à presença do OEG nos filmes edíveis, tendo sido maior o efeito protetor com o aumento da quantidade do óleo incorporado. As carnes sem proteção, ou revestidas com os filmes de caseinato de sódio sem OEG já se encontravam completamente deterioradas após 8 dias de armazenamento sob frio, enquanto que as amostras protegidas pelos demais filmes incorporados com OEG resistiram até o último dia de análise.

Os resultados das contagens dos coliformes totais seguiram o mesmo comportamento estabelecido para os MTV (Tabela 6.7). As maiores contaminações foram registradas nas carnes sem filme, seguida pelos alimentos embalados no PVC. As amostras embaladas nos filmes ativos apresentaram menores contaminações, tendo a MMTNa reduzido o poder antimicrobiano do quitosano (apesar de não ter sido com significância estatística $p>0,05$) enquanto que OEG aumentou esta característica ($p<0,05$). Entre as carnes embaladas nos filmes de quitosano incorporados com 0,5%, 1% ou 2% não foram observadas diferenças significativas entre as contagens de coliformes totais ($p>0,05$), entretanto um efeito da dose pôde ser observado uma vez que no décimo dia a menor contaminação foi registrada para as carnes protegidas nos filmes incorporados com a maior concentração de OEG.

Em comparação com a carne sem filme e a carne embalada no PVC, as amostras envolvidas no filme de qui + MMTNa + 2% OEG apresentaram uma redução na contagem dos coliformes totais em 4,5 e 4,2 logaritmos, respectivamente. Os OEG são extratos ricos em compostos fenólicos, monoterpenos, sesquiterpenos e aldeídos, os quais são os responsáveis pelos resultados reportados. O possível mecanismo de ação do OEG deve envolver o rompimento da membrana celular dos microrganismos com a penetração dos compostos bioativos, que irão causar danos no seu funcionamento celular (Noori *et al.*, 2018).

Os resultados são semelhantes aos observados para os filmes com o óleo essencial de alecrim apresentados no capítulo 5.

6.4. Considerações finais

De um modo geral, os filmes de quitosano incorporados com OEG foram produzidos de forma satisfatória, tendo sido alcançada elevada interação entre os componentes do (bio)-compósito (MMTNa, compostos ativos do OEG e o quitosano). Do ponto de vista morfológico, os filmes apresentaram homogeneidade, no entanto a incorporação do OEG causou algumas irregularidades na superfície das películas, tornando-as um pouco menos homogêneas e rugosas. O processo de esfoliação utilizado foi eficaz para obtenção de uma conformação intercalada, responsável pelas melhorias das propriedades mecânicas e de barreira do

oxigénio. A incorporação do OEG de um modo geral tornou os filmes mais frágeis, menos rígidos, com maiores permeabilidades do oxigénio e do vapor de água.

Do ponto de vista da bioatividade dos biopolímeros desenvolvidos, foram observadas atividades antimicrobianas e antioxidantes em ambos ensaios “in vitro” e “in situ”. Tendo sido possível prolongar a vida de prateleira da carne de frango fresca por pelo menos mais quatro dias.

Por meio da incorporação dos óleos essenciais nos materiais de embalagem é possível contornar as grandes barreiras do uso destes potentes conservantes naturais, nomeadamente: o seu custo elevado e o seu acentuado aroma que acaba por interferir nas características do alimento onde foi utilizado. Desta forma, em menores quantidades, incorporados nas embalagens, esta tecnologia torna-se viável tanto do ponto de vista económico quanto tecnológico.

Sendo assim, fazendo um balanço entre os melhores resultados na aplicação na carne, com as melhores propriedades funcionais dos filmes produzidos, conclui-se que o filme de quitosano incorporado com 1% de OEG é a melhor opção, uma vez que apresentou os melhores resultados nos testes “in situ” (juntamente com os filmes incorporados com 0,5% e 2% de OEG) com menores desvantagens do ponto de vista das propriedades mecânicas e de barreira resultantes da incorporação do OEG. Além disto, este filme foi o que apresentou uma opacidade intermédia, sendo uma boa barreira à luz UV, ao mesmo tempo que mantém uma relativamente alta transparência, que é um atributo muito valorizado pelos consumidores.

Parte dos resultados presentes neste capítulo encontra-se publicado num artigo na revista *Coatings* (Souza *et al.*, 2018).

Considerações finais

Os objetivos gerais assim como os objetivos específicos deste trabalho foram alcançados. Na primeira etapa das experiências foram testadas diferentes fontes de compostos naturais, para seleção das matrizes a utilizar na etapa posterior das experiências. Esta seleção teve em conta o potencial ativo (ensaio de migração e poder antioxidante) dos filmes incorporados com os óleos essenciais, uma vez que nos filmes adicionados com os extratos hidroalcoólicos não foi observada migração dos compostos ativos. Entre os cinco OEs avaliados, os que apresentaram melhor desempenho foram os de salva, alecrim e gengibre. Como os dois primeiros pertencem à mesma família de plantas, optou-se por prosseguir as experiências com os óleos de alecrim e gengibre. Ainda nesta fase, foi selecionada a argila a ser utilizada como nanorreforço do biopolímero de quitosano, tendo sido escolhida a montmorilonite sódica. Não se verificaram diferenças significativas entre as diferentes MMTs estudadas, em termos das suas propriedades mecânicas, uma vez que todas as argilas reforçaram de forma muito similar os filmes. Desta forma, a escolha da melhor montmorilonite foi baseada na hidrofiliabilidade das nanoargilas testadas, tendo-se optado pelas argilas mais hidrofílicas (que interagem mais com o quitosano), ou seja, as não modificadas (MMTNa ou MMTCa), descartando-se a MMT20. Entre as duas argilas naturais, apesar de se não ter observado diferenças significativas nas propriedades mecânicas, a montmorilonite sódica mostrou tendencialmente valores mais

elevados de tensão máxima com alterações intermédias no alongamento e módulo de elasticidade, e menores alterações nas propriedades óticas (opacidade e valores de hue* mais próximos da amostra controlo), sendo por isto a escolhida para a continuação das experiências. O processo de esfoliação utilizado para produzir os filmes também foi validado nesta etapa por meio dos ensaios de difração de raios-x e das propriedades mecânicas dos filmes.

Os novos biopolímeros já com a incorporação dos diferentes óleos em quatro diferentes concentrações, com ou sem incorporação da MMTNa foram produzidos.

A incorporação da MMTNa possibilitou a formação de filmes de quitosano com propriedades físicas melhoradas. A adição da nanoargila resultou em filmes mais resistentes e elásticos (menos rígidos), menos permeáveis ao oxigénio, menos solúveis em água (embora apresentando maior índice de intumescimento) e com maior barreira à luz (em especial na gama da radiação UV – acompanhado por ligeiro aumento da opacidade do material, o que pode ter vantagens em relação aos efeitos da luz nos alimentos, embora menos positivos do ponto de vista estético/visual). No entanto, a adição de nanoargila contribuiu para o aumento da permeabilidade ao vapor de água, o que pode limitar a sua aplicação. A incorporação do nanorreforço limita também a ação protetora do quitosano “in situ” contra a oxidação. Apesar dos filmes adicionados com a MMTNa apresentarem menor permeabilidade ao oxigénio, o aumento da permeabilidade ao vapor de água pode ter contribuído para estes resultados.

De modo a verificar se houve migração da montmorilonite sódica para o alimento após o contato da carne com os filmes de quitosano, foram quantificados os teores de sódio e magnésio na carne nos tempos zero, sete e quinze dias de armazenamento. Os teores médios iniciais de magnésio e sódio observados foram de $1,57 \pm 0,02$ g/kg carne e $3,2 \pm 0,09$ g/kg de carne, respetivamente. Nos tempos 7 e 15 houve uma redução da quantidade destes minerais nas amostras protegidas pelos filmes de quitosano independentemente de ele ter sido incorporado ou não com os óleos essenciais ou a MMTNa (em média observou-se uma redução aproximada de 16% e 21% no sétimo dia de armazenamento e de

21% e 43% no último dia de armazenamento, respetivamente para o magnésio e o sódio), por comparação com a carne sem proteção. Esta diminuição do teor de minerais na carne embalada provavelmente está atribuída ao poder dos filmes de absorver água, que na mesma medida adsorveu também a fração mineral do produto. Estes resultados são indícios de que não houve migração da MMTNa para a carne de frango embalada nas embalagens nanorreforçadas com esta argila, uma vez que não se registou aumento dos componentes químicos (sódio e magnésio) deste nanomaterial nas carnes após o período de contato com a embalagem. Resultados semelhantes foram reportados por Avella *et. al* (2005) para vegetais folhosos embalados em biopolímeros de amido incorporados com montmorilonite.

De forma oposta, a incorporação dos óleos essenciais contribuiu para a obtenção de filmes menos resistentes e mais elásticos, com maior permeabilidade ao oxigénio e vapor de água, embora a barreira à luz tenha sido melhorada (os filmes também ficaram mais opacos). A adição de óleos não produziu efeitos a nível da solubilidade dos filmes em água, mas contribuiu para a obtenção de menores valores de índice de intumescimento. Em contraposição, a adição dos óleos aos filmes contribuiu significativamente para a redução do crescimento microbiano e para a estabilidade oxidativa, por comparação com a ação do quitosano, quando os filmes foram aplicados “in situ” em carne de frango crua. Não foram observadas diferenças na qualidade das carnes devido aos diferentes óleos.

Quando os filmes são simultaneamente reforçados com a nanoargila e aditivados com os OEs, mantém-se o efeito plastificante dos OEs e o aumento das permeabilidades ao vapor de água e oxigénio, embora se verifique uma tendência para uma redução de PO com a incorporação da argila. O efeito sinérgico de OEs e MMTNa aumenta ainda mais a opacidade dos filmes e promove a solubilidade dos filmes em água, anulando o efeito da MMTNa de redução dessa solubilidade quando em combinação apenas com o quitosano, observando-se índices de intumescimento ainda mais reduzidos. A estabilidade oxidativa das amostras de carne foi afetada negativamente quando o nanorreforço e os OEs foram incorporados no quitosano, por comparação com a ação do quitosano sem

aditivos ou do quitosano contendo OEs, devido ao fato da nanoargila armadilhar os compostos ativos dos óleos essenciais na estrutura do filme esfoliado, com diminuição das propriedades ativas dos filmes. Por esta razão, não se observaram melhorias a nível da atividade antimicrobiana dos filmes contendo simultaneamente nanoargila e OEs por comparação com o quitosano sem aditivos.

Entre o melhor filme pontuado em cada capítulo – quitosano + 0,5% OEA (capítulo 5) e quitosano + 1% OEG (capítulo 6), comparando-se as suas propriedades funcionais, o filme com o óleo de alecrim é ligeiramente superior ao biopolímero adicionado com o OEG, apresentando melhores propriedades de barreira ao vapor de água e ao oxigénio, maior resistência à tração mecânica e menor opacidade. Desta forma, entre todos os filmes desenvolvidos, o biopolímero de quitosano incorporado com 0,5% de OEA parece ser o mais promissor.

No entanto, combinações com diferentes proporções dos dois óleos podem ainda ser estudadas de modo a verificar se um efeito sinérgico entre eles poderá melhorar tanto as propriedades ativas quanto funcionais dos filmes. Melhorar o sinergismo da MMT com os óleos, ao modificar a percentagem de argila no quitosano pode ser também uma opção de melhoria das propriedades ativas do OE e de reforço da MMT.

No entanto, ainda do ponto de vista da segurança alimentar, estudos de toxicidade tanto dos óleos essenciais quanto das montmorilonites são recomendados, pois apesar de não ter havido indícios de migração do nanomaterial para a carne, ainda assim é uma maior garantia para o consumidor.

Desta forma, como opções para trabalhos futuros pode-se sugerir:

- ✓ Estudos de toxicidade dos compostos ativos / nanomateriais utilizados em embalagens ativas;
- ✓ Estudos de nanoencapsulamento dos OEs com aplicação em filmes de quitosano;
- ✓ Estudos da biodegradabilidade das embalagens produzidas, com o objetivo de se verificar de que modo a incorporação de nanomateriais / agentes ativos interferem neste processo de biodegradação;

✓ Estudo da combinação de diferentes óleos em diferentes proporções como agentes ativos para embalagens alimentares; combinar a adição de OEs com nanoargilas de modo a otimizar as propriedades ativas dos OEs e a ação de reforço das argilas; estudar diferentes misturas de biopolímeros;

✓ Estudo de digestão simulada dos alimentos após contato com as embalagens, para verificar a biodisponibilidade dos compostos bioativos migrados para o alimento, ou seja, um indicativo do possível complemento funcional devido ao uso destas embalagens ativas.

✓ Estudo da utilização do quitosano incorporado com diferentes óleos em diferentes proporções aplicados como revestimento comestível para verificar o efeito no produto cozinhado, quer do ponto de vista da segurança alimentar, quer do ponto de vista da qualidade alimentar (por meio de análises sensoriais, de textura, físico-químicas e microbiológicas, assim como os ganhos funcionais).

8

Referências

- Abdollahi, M., Rezaei, M., & Farzi, G. (2012a). A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *Journal of Food Engineering*, 111(2), 343–350.
- Abdollahi, M., Rezaei, M., & Farzi, G. (2012b). Original article Improvement of active chitosan film properties with rosemary essential oil for food packaging, 847–853.
- Abdollahi, M., Rezaei, M., & Farzi, G. (2014). Influence of chitosan/clay functional bionanocomposite activated with rosemary essential oil on the shelf life of fresh silver carp. *International Journal of Food Science and Technology*, 49(3), 811–818.
- Acevedo-Fani, A., Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., & Martín-Belloso, O. (2015). Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*, 47, 168–177.
- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46–55.
- Afanas'eva, N. V., Petrova, V. A., Vlasova, E. N., Gladchenko, S. V., Khayrullin, A. R., Volchek, B. Z., & Bochek, A. M. (2013). Molecular mobility of chitosan

- and its interaction with montmorillonite in composite films: Dielectric spectroscopy and FTIR studies. *Polymer Science Series A*, 55(12), 738–748.
- Aguirre, A., Borneo, R., & León, A. E. (2013). Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. *Food Bioscience*, 1, 2–9.
- Alizadeh, V., Barzegar, H., Nasehi, B., & Samavati, V. (2018). Development of a chitosan-montmorillonite nanocomposite film containing *Satureja hortensis* essential oil. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 13(6), 131–143.
- Almajano, M. P., Carbó, R., Jiménez, J. A. L., & Gordon, M. H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108(1), 55–63.
- Almeida, J. S., Lima, F., Ros, S. Da, Bulhões, L. O. S., de Carvalho, L. M., & Beck, R. C. R. (2010). Nanostructured systems containing rutin: in vitro antioxidant activity and photostability studies. *Nanoscale Research Letters*, 5(10), 1603–1610.
- Altıok, D., Altıok, E., & Tihminlioglu, F. (2010). Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 21(7), 2227–36.
- Alves, V. D., Costa, N., & Coelho, I. M. (2010). Barrier properties of biodegradable composite films based on kappa-carrageenan/pectin blends and mica flakes. *Carbohydrate Polymers*, 79(2), 269–276.
- Aranaz, I., Mengibar, M., & Harris, R. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*, 3(2), 203–230.
- Araújo, J. M. A. (2011). *Química de alimentos: teoria e prática* (5ª edição). Editora UVF. Viçosa. 611p.
- Arfat, Y. A., Benjakul, S., Prodpran, T., Sumpavapol, P., & Songtipya, P. (2014). Properties and antimicrobial activity of fish protein isolate/fish skin gelatin film containing basil leaf essential oil and zinc oxide nanoparticles. *Food*

Hydrocolloids, 41, 265–273.

- Arkoun, M., Daigle, F., Holley, R. A., Heuzey, M. C., & Ajji, A. (2018). Chitosan-based nanofibers as bioactive meat packaging materials. *Packaging Technology and Science*, (May 2017), 1–11.
- Assis, O. B. G., & Alves, H. C. (2002). Comunicado Técnico 49 - Metodologia mínima para produção de filmes comestíveis de quitosana e avaliação preliminar de seu uso em revestimento protetor em maçãs cortadas. *MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento) - Embrapa*, São Carlos, 5p.
- Assis, S. A., Velloso, J. C. R., Brunetti, I. L., Khalil, N. M., Leite, K. M. D. S. C., Martins, A. B. G., & Oliveira, O. M. M. D. F. (2009). Antioxidant activity, ascorbic acid and total phenol of exotic fruits occurring in Brazil. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(5), 439–48.
- ASTM. (2001). Standard Methods for Determining the Antimicrobial Activity of Immobilized Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions. *ASTM - America Society Standard Testing and Materials*, (E2149-1).
- ASTM - America Society Standard Testing and Materials. (2012). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting - D882-12, (D882-12), 12.
- Atarés, L., Bonilla, J., & Chiralt, A. (2010). Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 100(4), 678–687.
- Atarés, L., & Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 48, 51–62.
- Atarés, L., Pérez-Masiá, R., & Chiralt, A. (2011). The role of some antioxidants in the HPMC film properties and lipid protection in coated toasted almonds. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 649–656.
- Avella, M., Bonadies, E., Martuscelli, E., & Rimedio, R. (2001). European current standardization for plastic packaging recoverable through composting and

- biodegradation. *Polymer Testing*, 20(5), 517–521.
- Avella, M., De Vlieger, J. J., Errico, M. E., Fischer, S., Vacca, P., & Volpe, M. G. (2005). Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. *Food Chemistry*, 93(3), 467–474.
- Ávila, A., Bierbrauer, K., Pucci, G., López-González, M., & Strumia, M. (2012). Study of optimization of the synthesis and properties of biocomposite films based on grafted chitosan. *Journal of Food Engineering*, 109(4), 752–761.
- Azeredo, H. M. C., Faria, J. A. F., & Brito, E. S. (2012). Embalagens e suas interações com os alimentos. Em Azeredo, H. M. C. (Ed.), *Fundamentos de estabilidade de alimentos*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. (2nd ed., p. 328)
- Azeredo, H. M. C., Mattoso, L. H. C., & McHugh, T. H. (2011). Nanocomposites in Food Packaging – A Review. Em Reddy, B. (Ed.), *Advances in Diverse Industrial Applications of Nanocomposites* (p. 550). InTech.
- Azeredo, H. M. C. (2009). Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International*, 42(9), 1240–1253.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436.
- Bacakova, L., Grausova, L., Vacik, J., Kromka, A., Biederman, H., Choukourov, A., & Sary, V. (2011). *Advances in Diverse Industrial Applications of Nanocomposites*. Em Reddy, B. (Ed.), *Advances in Diverse Industrial Applications of Nanocomposites*. InTech. 550p.
- Badawy, M. E. I., & Abdelgaleil, S. A. M. (2014). Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. *Industrial Crops and Products*, 52, 776–782.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203.

- Baldwin, E. A., Hagenmaier, R. D., & Bai, J. (2012). *Edible coatings and films to improve food quality*. CRC Press. 460p.
- Barbosa-Pereira, L., Aurrekoetxea, G. P., Angulo, I., Paseiro-Losada, P., & Cruz, J. M. (2014). Development of new active packaging films coated with natural phenolic compounds to improve the oxidative stability of beef. *Meat Science*, 97(2), 249–54.
- Barbosa-Pereira, L., Cruz, J. M., Sendón, R., Quirós, A. R. B., Ares, A., Castro-López, M., Abad, M. J., Marotod, J., Paseiro-Losada, P. (2013). Development of antioxidant active films containing tocopherols to extend the shelf life of fish. *Food Control*, 31(1), 236–243.
- Barbosa, L. C. de A. (2007). *Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos* (1ª edição). (Editora UFV) . Viçosa. 189p.
- Beigzadeh Ghelejlou, S., Esmaili, M., & Almasi, H. (2016). Characterization of chitosan-nanoclay bionanocomposite active films containing milk thistle extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 613–621.
- Bergmann, M., Tekman, M. B., & Gutow, L. (2017). Marine litter: Sea change for plastic pollution. *Nature*, 544(7650), 297–297.
- Bitencourt, C. M., Fávaro-Trindade, C. S., Sobral, P. J. A., & Carvalho, R. A. (2014). Gelatin-based films additivated with curcuma ethanol extract: Antioxidant activity and physical properties of films. *Food Hydrocolloids*, 40,
- Bolumar, T., Andersen, M. L., & Orlie, V. (2011). Antioxidant active packaging for chicken meat processed by high pressure treatment. *Food Chemistry*, 129(4), 1406–1412.
- Bonilla, J., & Sobral, P. J. A. (2016). Investigation of the physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts. *Food Bioscience*, 16, 17–25.
- Bradley, E. L., Castle, L., & Chaudhry, Q. (2011). Applications of nanomaterials in food packaging with a consideration of opportunities for developing countries. *Trends in Food Science & Technology*, 22(11), 604–610.

- Brasil, (ANVISA). (1999). *Resolução No 105, de 19 de maio de 1999. Aprova o Regulamento Técnico “Disposições Gerais para Embalagens e Equipamentos Plásticos em contato com Alimentos.”*
- Brasil, (ANVISA). (2002). *Resolução RDC no 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores / Industrializadores de Alimentos.*
- Brasil, (ANVISA). (2008). *Resolução no 17, de 17 de março de 2008. Regulamento Técnico sobre lista positiva de aditivos para materiais plásticos destinados à elaboração de embalagens e equipamentos em contato com alimentos.*
- Brasil, (ANVISA). (2010). *RDC N°51, de 6 de Outubro de 2010. Dispõe sobre migração em materiais, embalagens e equipamentos plásticos destinados a entrar em contato com alimentos.*
- Brasil, (ANVISA). (2011). *Resolução no 91, de 11 de maio de 2001. Aprova o regulamento técnico - Critérios gerais e classificação de materiais para embalagens e equipamentos em contato com alimento.*
- Brewer, M. S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 221–247.
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
- BYK. (2013a). *Cloisite® 20 Data Sheet*. Disponível em www.byk.com/additives. Acessado em 15 de setembro de 2015.
- BYK. (2013b). *Cloisite® Ca⁺⁺ Data Sheet*. Disponível em www.byk.com/additives. Acessado em 15 de setembro de 2015.
- BYK. (2013c). *Cloisite® Na⁺ Data Sheet*. Disponível em www.byk.com/additives. Acessado em 15 de setembro de 2015.

- Calatayud, M., López-de-Dicastillo, C., López-Carballo, G., Vélez, D., Hernández Muñoz, P., & Gavara, R. (2013). Active films based on cocoa extract with antioxidant, antimicrobial and biological applications. *Food Chemistry*, 139(1–4), 51–8.
- Camilloto, G. P. (2009). *Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa incorporada com produto à base de triclosan para aplicação em carne bovina*. Universidade Federal de Viçosa. Tese de mestrado.
- Cannarsi, M., Baiano, A., Marino, R., Sinigaglia, M., & Del Nobile, M. A. (2005). Use of biodegradable films for fresh cut beef steaks packaging. *Meat Science*, 70(2), 259–265.
- Carson, C. F., Hammer, K. a, & Riley, T. V. (2006). *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 50–62.
- Casariego, A., Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Teixeira, J. A., Cruz, L., Díaz, R., & Vicente, A. A. (2009). Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1895–1902.
- Castel, C. D. (2012). *Estudo comparativo na obtenção de nanocompósitos de polipropileno/montmorilonita utilizando diferentes rotas de síntese*. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Tese de doutoramento.
- Castro, V. C., da Silva, P. H. A., de Oliveira, E. B., Desobry, S., & Humeau, C. (2014). Extraction, identification and enzymatic synthesis of acylated derivatives of anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) fruits. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(1), 196–204.
- Cerisuelo, J. P., Alonso, J., Aucejo, S., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2012). Modifications induced by the addition of a nanoclay in the functional and active properties of an EVOH film containing carvacrol for food packaging. *Journal of Membrane Science*, 423–424, 247–256.
- Chan, E. W. C., Lim, Y. Y., Chong, K. L., Tan, J. B. L., & Wong, S. K. (2010). Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas. *Journal of Food*

- Composition and Analysis*, 23(2), 185–189.
- Chandra, R., & Rustgi, R. (1998). Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, 23(7), 1273–1335.
- Chaudhry, Q., Scotter, M., Blackburn, J., Ross, B., Boxall, A., Castle, L., Aitken, R., & Watkins, R. (2008). Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 25(3), 241–258.
- Chivrac, F., Pollet, E., & Avérous, L. (2009). Progress in nano-biocomposites based on polysaccharides and nanoclays. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 67(1), 1–17.
- Chungy, D., Papadakis, S. E., & Yamy, K. L. (2002). Simple models for assessing migration from food-packaging ® lms. *Food Additives and Contaminants*, 19(6), 611–617.
- Cipriano, P. A. (2011). *Antocianinas de açaí (Euterpe oleracea Mart.) e casca de jaboticaba (Myrciaria jaboticaba) na formulação de bebidas isotônicas*. Universidade Federal de Viçosa. Tese de mestrado.
- Coelho, A. C. V., Santos, P. D. S., & Santos, H. D. S. (2007). Argilas especiais: argilas quimicamente modificadas - uma revisão. *Química Nova*, 30(5), 1282–1294.
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78(1–2), 90–103.
- Contini, C., Álvarez, R., O’Sullivan, M., Dowling, D. P., Gargan, S. Ó., & Monahan, F. J. (2014). Effect of an active packaging with citrus extract on lipid oxidation and sensory quality of cooked turkey meat. *Meat Science*, 96(3), 1171–6.
- Contini, C., Katsikogianni, M. G., O’Neill, F. T., O’Sullivan, M., Dowling, D. P., & Monahan, F. J. (2011). Development of active packaging containing natural antioxidants. *Procedia Food Science*, 1(Icef 11), 224–228.
- Cullity, B. D. (1978). *Elements of diffraction* (Segunda Edição). Addison-Wesley

Publishing Company, Inc. 555p.

- Cushen, M., Kerry, J., Morris, M., Cruz-Romero, M., & Cummins, E. (2012). Nanotechnologies in the food industry – Recent developments, risks and regulation. *Trends in Food Science & Technology*, 24(1), 30–46.
- Dahmoune, F., Spigno, G., Moussi, K., Remini, H., Cherbal, A., & Madani, K. (2014). Pistacia lentiscus leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Industrial Crops and Products*, 61, 31–40.
- Darder, M., Colilla, M., & Ruiz-Hitzky, E. (2003). Biopolymer–Clay Nanocomposites Based on Chitosan Intercalated in Montmorillonite. *Chemistry of Materials*, 15(20), 3774–3780.
- Del Pozo-Insfran, D., Brenes, C. H., & Talcott, S. T. (2004). Phytochemical composition and pigment stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1539–45.
- Dias, M. V. (2012). *Filmes a base de quitosana incorporados com α -tocoferol e montmorilonita para aplicação em embalagens funcional e antioxidante*. Universidade Federal de Lavras. Tese de doutoramento.
- Dias, M. V., Machado Azevedo, V., Borges, S. V., Soares, N. D. F. F., de Barros Fernandes, R. V., Marques, J. J., & Medeiros, É. A. A. (2014). Development of chitosan/montmorillonite nanocomposites with encapsulated α -tocopherol. *Food Chemistry*, 165, 323–329.
- Duncan, T. V. (2011). Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363(1), 1–24.
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114, 1173–1182.
- Economou, T., Pournis, N., Ntzimani, A., & Savvaidis, I. N. (2009). Nisin-EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken

- meat shelf-life. *Food Chemistry*, 114(4), 1470–1476.
- El-Ghorab, A. H., Nauman, M., Anjum, F. M., Hussain, S., & Nadeem, M. (2010). A comparative study on chemical composition and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale*) and cumin (*Cuminum cyminum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8231–8237.
- Espitia, P. J. P., Soares, N. D. F. F., Teófilo, R. F., Coimbra, J. S. D. R., Vitor, D. M., Batista, R. A., Ferreira, S.O., Andrade, N. J., & Medeiros, E. A. A. (2013). Physical-mechanical and antimicrobial properties of nanocomposite films with pediocin and ZnO nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 199–208.
- European Commission. (2004). *Regulation (EU) No 1935/2004 of 27 October 2004 on plastic materials and articles intended to come into contact with food and repealing Directives 80/590/EEC and 89/109/EEC*.
- European Commission. (2006). *Regulation (EU) No 2023/2006 of 22 December 2006 on good manufacturing practice for materials and articles intended to come into contact with food*.
- European Commission. (2009). Commission Regulation (EC) No. 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. *Official Journal of European Union*, L 135(450), 3–11.
- European Commission. (2011). *Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food*.
- FAO. (2013). *Poultry Development Review*. Disponível em www.fao.org/publications. Acessado em 10 agosto de 2017.
- Faria, F. de O., Vercelheze, A. E. S., & Mali, S. (2012). Propriedades físicas de filmes biodegradáveis à base de amido de mandioca, álcool polivinílico e montmorilonita. *Quim. Nova*, 35(3), 487–492.
- FDA. (2012). *Code of Federal Regulations. Title 21: Food and Drugs, Parts 170 to 190. v. 3. Chapter I: Food and drug administration department of health and human services; subchapter b--food for human consumption (continued). Part 170: Food Additives. Subpart §170.3*.

- FDA. (2017). *Code of Federal Regulation. Title 21: Food and Drugs. Chapter I – Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services (Continued), Subchapter B – Food for Human Consumption (Continued), Part 184 – INDI. Office of the Federal Register. 2017.*
- Felisberto, R., Lamas, L., Lopes, M., Sousa, P., & Rodrigues, A. L. (2011). Lipoperoxidação dos óleos alimentares. *Rev. Lusófana de Ciência E Medicina Veterinária*, 4, 12–17.
- Ferreira, A. R. V., Torres, C. A. V., Freitas, F., Sevrin, C., Grandfils, C., Reis, M. A. M., Alves, V. D., & Coelho, I. M. (2016). Development and characterization of bilayer films of FucoPol and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 147, 8–15.
- Ferreira, A. R. V., Bandarra, N. M., Moldão-Martins, M., Coelho, I. M., & Alves, V. D. (2018). FucoPol and chitosan bilayer films for walnut kernels and oil preservation. *LWT - Food Science and Technology*, 91(December 2017), 34–39.
- Fischer, U. a, Carle, R., & Kammerer, D. R. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS(n). *Food Chemistry*, 127(2), 807–21.
- Fortunati, E., Peltzer, M., Armentano, I., Jiménez, A., & Kenny, J. M. (2013). Combined effects of cellulose nanocrystals and silver nanoparticles on the barrier and migration properties of PLA nano-biocomposites. *Journal of Food Engineering*, 118(1), 117–124.
- Gandini, A., & Belgacem, M. N. (2013). 4 *The State of the Art of Polymers from Renewable Resources. Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications.* Elsevier. 71-85.
- Ghaderi-Ghahfarokhi, M., Barzegar, M., Sahari, M. A., Ahmadi Gavlighi, H., & Gardini, F. (2017). Chitosan-cinnamon essential oil nano-formulation: Application as a novel additive for controlled release and shelf life extension of beef patties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 19–

28.

- Ghanbarzadeh, B., Oleyaei, S. A., & Almasi, H. (2015). Nanostructured materials utilized in biopolymer-based plastics for food packaging applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(12), 1699–1723.
- Giannakas, A., Patsaoura, A., Barkoula, N. M., & Ladavos, A. (2017). A novel solution blending method for using olive oil and corn oil as plasticizers in chitosan based organoclay nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 157, 550–557.
- Gomes, C. S. F. (1988). *Argilas: o que são e para que servem*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 457p.
- Gómez-Estaca, J., López-de-Dicastillo, C., Hernández-Muñoz, P., Catalá, R., & Gavara, R. (2014). Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 35(1), 42–51.
- Goyal, S., & Goyal, G. K. (2012). Nanotechnology in food packaging - a critical review. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*, 10(10), 14–24.
- Günister, E., Pestreli, D., Ünlü, C. H., Atıcı, O., & Güngör, N. (2007). Synthesis and characterization of chitosan-MMT biocomposite systems. *Carbohydrate Polymers*, 67(3), 358–365. h
- Hafsa, J., Smach, M. ali, Ben Khedher, M. R., Charfeddine, B., Limem, K., Majdoub, H., & Rouatbi, S. (2016). Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 356–364.
- Higueras, L., López-carballo, G., Cerisuelo, J. P., & Gavara, R. (2012). Preparation and characterization of chitosan/HP- β -cyclodextrins composites with high sorption capacity for carvacrol, 97(2013), 262–268.
- Huber, L. S., & Rodriguez-amaya, D. B. (2008). Flavonóis e flavonas: Fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. *Alimentos Nutrição*, 19(1), 97–108.

- IAL. (2008). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos* (4^o Edição). São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 1020p.
- Imran, M., Revol-Junelles, A.-M., Martyn, A., Tehrany, E. A., Jacquot, M., Linder, M., & Desobry, S. (2010). Active food packaging evolution: transformation from micro- to nanotechnology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(9), 799–821.
- ISO. (2006). *ISO 4831:2006(en) Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms — Most probable number technique*.
- ISO. (2013). *ISO 4833-1:2013 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the enumeration of microorganisms -- Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique*.
- Istv, S. (2012). Active and intelligent packaging of food (Capítulo 2, 23-48p.), em Bhat R., Alias, A. K., & Paliyath, G. (Ed.), *Progress in Food Preservation*. John Wiley & Sons Ltd. 630p.
- Jamshidian, M., Tehrany, E. A., & Desobry, S. (2012). Antioxidants release from solvent-cast pla film: Investigation of PLA antioxidant-active packaging. *Food and Bioprocess Technology*, 6(6), 1450–1463.
- Jridi, M., Hajji, S., Ayed, H. Ben, Lassoued, I., Mbarek, A., Kammoun, M., Souissi, N., & Nasri, M. (2014). Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin-chitosan composite edible films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67, 373–9.
- Jung, Y. C., & Bhushan, B. (2006). Contact angle, adhesion and friction properties of micro-and nanopatterned polymers for superhydrophobicity. *Nanotechnology*, 17(19), 4970–4980.
- Kaewprachu, P., Osako, K., Benjakul, S., & Rawdkuen, S. (2015). Quality attributes of minced pork wrapped with catechin-lysozyme incorporated gelatin film. *Food Packaging and Shelf Life*, 3, 88–96.
- Kanatt, S. R., Rao, M. S., Chawla, S. P., & Sharma, A. (2012). Active chitosan–polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 290–

- Kim, K. W., & Thomas, R. (2007). Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Food Chemistry*, 101(1), 308–313.
- Kim, Y., & White, J. L. (2006). Modeling of polymer/clay nanocomposite formation. *Journal of Applied Polymer Science*, 101(3), 1657–1663.
- Kolakowska, A., & Bartosz, G. (2014). Oxidation of Food Components: An Introduction. Em Bartosz, G. (Ed.), *Food Oxidants and Antioxidants Chemical, Biological and Functional Properties* (p. 550). CRC Press.
- Kristo, E., Koutsoumanis, K. P., & Biliaderis, C. G. (2008). Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, 22(3), 373–386.
- Labuza, T. P., & Breene, W. M. (1989). Applications of “active packaging” for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 13(1), 1–69.
- Lagaron, J. M., Catalá, R., & Gavara, R. (2004). Structural characteristics defining high barrier properties in polymeric materials. *Materials Science and Technology*, 20(1), 1–7.
- Latou, E., Mexis, S. F., Badeka, A. V., Kontakos, S., & Kontominas, M. G. (2014). Combined effect of chitosan and modified atmosphere packaging for shelf life extension of chicken breast fillets. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 263–268.
- Lavorgna, M., Piscitelli, F., Mangiacapra, P., & Buonocore, G. G. (2010). Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 291–298.
- Lee, S. Y., Lee, S. J., Choi, D. S., & Hur, S. J. (2015). Current topics in active and intelligent food packaging for preservation of fresh foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(14), 2799–2810.
- Leite-Legatti, A. V., Batista, Â. G., Dragano, N. R. V., Marques, A. C., Malta, L.

- G., Riccio, M. F., Eberlin, M. N., Machado, A. R. T., Carvalho-Silva, L. B., Ruiz, A. L. T. G., Carvalho, J. E., Pastore, G. M., & Maróstica, M. R. (2012). Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. *Food Research International*, 49(1), 596–603.
- Lewandowska, K. (2015). Physico-chemical properties of chitosan composites with synthetic polymers and inorganic additives. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives*, XX, 162–169.
- Lewandowska, K., Sionkowska, A., Kaczmarek, B., & Furtos, G. (2014). Characterization of chitosan composites with various clays. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, 534–541.
- Liu, H., Qiu, N., Ding, H., & Yao, R. (2008). Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. *Food Research International*, 41(4), 363–370.
- Liu, Y., Cai, Y., Jiang, X., Wu, J., & Le, X. (2016). Food Hydrocolloids Molecular interactions, characterization and antimicrobial activity of curcumin e chitosan blend fi lms, 52, 564–572.
- López-de-Dicastillo, C., Gómez-Estaca, J., Catalá, R., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2012). Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. *Food Chemistry*, 131(4), 1376–1384.
- López-Mata, M. A., Ruiz-Cruz, S., Silva-Beltrán, N. P., Ornelas-Paz, J. D. J., Zamudio-Flores, P. B., & Burruel-Ibarra, S. E. (2013). Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with carvacrol. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(11), 13735–53.
- López, E. I. C., Balcázar, M. F. H., Mendoza, J. M. R., Ortiz, A. D. R., Melo, M. T. O., Parrales, R. S., & Delgado, T. H. (2017). Antimicrobial activity of essential oil of *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae). *American Journal of Plant Sciences*, 8(7), 1511–1524.
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R., & Nerín, C. (2005). Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected

- foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6939–46.
- Lopez de Dicastillo, C., Nerin, C., Alfaro, P., Catala, R., Gavara, R., & Hernandez-Munoz, P. (2011). Development of new antioxidant active packaging films based on ethylene vinyl alcohol copolymer (EVOH) and green tea extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7832–40.
- Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F., & Nava-Saucedo, J. E. (2008). Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques - A review. *Chemosphere*, 73(4), 429–442.
- Ludueña, L. N., Vázquez, A., & Alvarez, V. A. (2013). Effect of the type of clay organo-modifier on the morphology, thermal/mechanical/impact/barrier properties and biodegradation in soil of polycaprolactone/clay nanocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*, 128(5), 2648–2657.
- Lvov, Y., & Abdullayev, E. (2013). Functional polymer–clay nanotube composites with sustained release of chemical agents. *Progress in Polymer Science*, 38(10–11), 1690–1719.
- Márquez-Ruiz, G., Holgado, F., & Velasco, J. (2014). Mechanisms of Oxidation in Food Lipids. Em G. Bartosz (Ed.), *Food Oxidants and Antioxidants Chemical, Biological, and Functional Properties* (p. 550). CRC Press.
- Marx, W., & Barth, A. (2010). Carbon Nanotubes - A scientometric study. In J. M. Marulanda (Ed.), *Carbon Nanotubes* (p. 766). InTech.
- Mathew, S., & Abraham, T. E. (2008). Characterisation of ferulic acid incorporated starch–chitosan blend films. *Food Hydrocolloids*, 22(5), 826–835.
- Mayachiew, P., & Devahastin, S. (2010). Effects of drying methods and conditions on release characteristics of edible chitosan films enriched with Indian gooseberry extract. *Food Chemistry*, 118(3), 594–601.
- Medina-Jaramillo, C., Ochoa-Yepes, O., Bernal, C., & Famá, L. (2017). Active and smart biodegradable packaging based on starch and natural extracts. *Carbohydrate Polymers*, 176(May), 187–194.

- Mehdizadeh, T., Tajik, H., Mehdi, S., Rohani, R., & Oromiehie, A. R. (2012). Antibacterial , antioxidant and optical properties of edible starch-chitosan composite film containing *Thymus kotschyanus* essential oil. *Veterinary Research Forum*, 3(3), 167–173.
- Melo, A. A. M., Geraldine, R. M., Silveira, M. F. A., Lopes, M. C., Silva, C., Fernandes, T. H., & Oliveira, A. N. (2012). Microbiological quality and other characteristics of refrigerated chicken meat in microbiological quality and other characteristics of refrigerated chicken meat in contact with cellulose acetate-based film incorporated with rosemary essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1419–1427.
- Mihindukulasuriya, S. D. F. D. F., & Lim, L.-T. T. (2014). Nanotechnology development in food packaging: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 40(2), 149–167.
- Miller, K. S., & Krochta, J. M. (1997). Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 8(7), 228–237.
- MINOLTA. (2007). *PRECISE COLOR COMMUNICATION: color control from perception to instrumentation*. JAPAN: Minolta Co. Ltda. Disponível em https://www.konicaminolta.com/instruments/knowledge/color/pdf/color_communication.pdf. Acessado em 10 de fevereiro de 2016.
- Moo-Huchin, V. M., Estrada-Mota, I., Estrada-León, R., Cuevas-Glory, L., Ortiz-Vázquez, E., Vargas y Vargas, M. D. L., Betancur-Ancona, D., & Sauri-Duch, E. (2014). Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 152, 508–15.
- Moo-Huchin, V. M., Moo-Huchin, M. I., Estrada-León, R. J., Cuevas-Glory, L., Estrada-Mota, I. a, Ortiz-Vázquez, E., Betancur-Ancona, D., & Sauri-Duch, E. (2015). Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 166, 17–22.

- Moradi, M., Tajik, H., Razavi Rohani, S. M., Oromiehie, A. R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J., & Hadian, M. (2012). Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT - Food Science and Technology*, 46(2), 477–484.
- Munteanu, B. S., Aytac, Z., Pricope, G. M., Uyar, T., & Vasile, C. (2014). Polylactic acid (PLA)/Silver-NP/VitaminE bionanocomposite electrospun nanofibers with antibacterial and antioxidant activity. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(10), 2643.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–1474.
- Neethirajan, S., & Jayas, D. S. (2010). Nanotechnology for the Food and Bioprocessing Industries. *Food and Bioprocess Technology*, 4(1), 39–47.
- Nerín, C., Tovar, L., & Salafranca, J. (2008). Behaviour of a new antioxidant active film versus oxidizable model compounds. *Journal of Food Engineering*, 84(2), 313–320.
- Noori, S., Zeynali, F., & Almasi, H. (2018). Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets. *Food Control*, 84, 312–320.
- Noshirvani, N., Ghanbarzadeh, B., Gardrat, C., Rezaei, M. R., Hashemi, M., Le Coz, C., & Coma, V. (2017). Cinnamon and ginger essential oils to improve antifungal, physical and mechanical properties of chitosan-carboxymethyl cellulose films. *Food Hydrocolloids*, 70, 36–45.
- Nouri, A., Yarak, M. T., Ghorbanpour, M., Agarwal, S., & Gupta, V. K. (2017). Enhanced antibacterial effect of chitosan film using Montmorillonite/CuO nanocomposite. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1219–1231.
- Nunes, C., Maricato, É., Cunha, Â., Nunes, A., da Silva, J. A. L., & Coimbra, M. A. (2013). Chitosan-cafeic acid-genipin films presenting enhanced antioxidant activity and stability in acidic media. *Carbohydrate Polymers*,

91(1), 236–43.

OECD-FAO. (2016). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025*. Paris: OECD Publishing. https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-en

Oliveira, T. M., Soares, N. F. F., Paula, C. D., & Viana, G. A. (2008). Uso de embalagem ativa na inibição do escurecimento enzimático de maçãs *Semina: Ciências Agrárias*, 29 (1), 117-128.

Paiva, L. B., Morales, A. R., & Guimarães, T. R. (2006). Propriedades mecânicas de nanocompósitos de polipropileno e montmorilonita organofílica. *Polímeros*, 16(2), 136–140.

Paiva, L. B., Morales, A. R., & Díaz, F. R. V. (2008). Argilas organofílicas: características, metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização. *Cerâmica*, 54(330), 213–226.

Paluszkiewicz, C., Stodolak, E., Hasik, M., & Blazewicz, M. (2011). FT-IR study of montmorillonite–chitosan nanocomposite materials. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 79(4), 784–788.

Park, S.-I., & Zhao, Y. (2004). Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 1933–9.

Park, S., & Zhao, Y. (2006). Development and characterization of edible films from cranberry pomace extracts. *Journal of Food Science*, 71(2), E95–E101.

Pascoal, A., Quirantes-Piné, R., Fernando, A. L., Alexopoulou, E., & Segura-Carretero, A. (2015). Phenolic composition and antioxidant activity of kenaf leaves. *Industrial Crops and Products*, 78, 116–123.

Pastor, C., Sánchez-González, L., Chiralt, A., Cháfer, M., & González-Martínez, C. (2013). Physical and antioxidant properties of chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 272–280.

Pazos, M., & Medina, I. (2014). Oxidation occurring in food systems. Em Bartosz, G. (Ed.), *Food Oxidants and Antioxidants Chemical, Biological and*

*Functional Properties*² (p. 550). CRC Press.

- Peng, Y., & Li, Y. (2014). Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 36(2014), 287–293.
- Perdones, Á., Chiralt, A., & Vargas, M. (2016). Properties of film-forming dispersions and films based on chitosan containing basil or thyme essential oil. *Food Hydrocolloids*, 57, 271–279.
- Perdones, Á., Vargas, M., Atarés, L., & Chiralt, A. (2014). Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan–cinnamon leaf oil films as affected by oleic acid. *Food Hydrocolloids*, 36(2014), 256–264.
- Pereira de Abreu, D. A., Paseiro Losada, P., Maroto, J., & Cruz, J. M. (2011). Natural antioxidant active packaging film and its effect on lipid damage in frozen blue shark (*Prionace glauca*). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(1), 50–55.
- Petersen, K., Væggemose Nielsen, P., Bertelsen, G., Lawther, M., Olsen, M. B., Nilsson, N. H., & Mortensen, G. (1999). Potential of biobased materials for food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 10(2), 52–68.
- Petrou, S., Tsiraki, M., Giatrakou, V., & Savvaidis, I. N. (2012). Chitosan dipping or oregano oil treatments, singly or combined on modified atmosphere packaged chicken breast meat. *International Journal of Food Microbiology*, 156(3), 264–271.
- Pires, J. R. A., Souza, V. G. L., Fernando, A. L. (2018). Chitosan/montmorillonite bionanocomposites incorporated with rosemary and ginger essential oil as packaging for fresh poultry meat. *Food Packaging and Shelf Life*, 17, 142–149.
- Pires, J. R. A., Souza, V. G. L., Fernando A. L. (2019). Production of nanocellulose from lignocellulosic biomass wastes: Prospects and Limitations. *Lecture Notes in Electrical Engineering*, 505, 719–725.
- Pola, C. C., Medeiros, E. A. A., Pereira, O. L., Souza, V. G. L., Otoni, C. G., Camilloto, G. P., & Soares, N. F. F. (2016). Cellulose acetate active films

- incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. *Food Packaging and Shelf Life*, 9, 69–78.
- Prasad, P., & Kochhar, A. (2014). Active Packaging in Food Industry: A Review. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8(5), 01–07.
- Qin, Y. Y., Zhang, Z. H., Li, L., Yuan, M. L., Fan, J., & Zhao, T. R. (2015). Physio-mechanical properties of an active chitosan film incorporated with montmorillonite and natural antioxidants extracted from pomegranate rind. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1471–1479.
- Ramvalho, V. C., & Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *QUIMICA NOVA*, 29(4), 755–760.
- Ramos, M., Beltrán, A., Peltzer, M., Valente, A. J. M., & Garrigós, M. D. C. (2014). Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. *LWT - Food Science and Technology*, 58(2), 470–477. h
- Ramos, M., Jiménez, A., Peltzer, M., & Garrigós, M. C. (2014). Development of novel nano-biocomposite antioxidant films based on poly (lactic acid) and thymol for active packaging. *Food Chemistry*, 162, 149–55.
- Reddy, M. M., Vivekanandhan, S., Misra, M., Bhatia, S. K., & Mohanty, A. K. (2013). Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. *Progress in Polymer Science*, 38(10–11), 1653–1689.
- Rees, C. E. D., Doyle, L., & Taylor, C. M. (2017). *Listeria monocytogenes*. In *Foodborne Diseases* (Vol. L322, pp. 253–276). Elsevier.
- Regnier, T., Combrinck, S., & Du Plooy, W. (2012). Essential oils and other plant extracts as food preservatives. In *Progress in Food Preservation* (pp. 539–579). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Remya, S., Mohan, C. O., Bindu, J., Sivaraman, G. K., Venkateshwarlu, G., & Ravishankar, C. N. (2016). Effect of chitosan based active packaging film on the keeping quality of chilled stored barracuda fish. *Journal of Food Science*

- and Technology*, 53(1), 685–693.
- Rhim, J.-W., Hong, S.-I., Park, H.-M., Ng, P. K. W., & Erry, P. K. W. N. G. (2006). Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16), 5814–5822.
- Rhim, J.-W., & Ng, P. K. W. (2007). Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(4), 411–33.
- Rhim, J.-W., Park, H.-M., & Ha, C.-S. (2013). Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science*, 38(10–11), 1629–1652.
- Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., Melo, N. R., & Sanches-Silva, A. (2017). Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, 61, 132–140.
- Ribeiro-Santos, R., Carvalho-Costa, D., Cavaleiro, C., Costa, H. S., Albuquerque, T. G., Castilho, M. C., Ramos, F., Melo, N.R., & Sanches-Silva, A. (2015). A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 355–368.
- Ribeiro-Santos, R., Melo, N. R., Andrade, M., & Sanches-Silva, A. (2017). Potential of migration of active compounds from protein-based films with essential oils to a food and a food simulant. *Packaging Technology and Science*, 30(12), 791–798.
- Rimdusit, S., Jingjid, S., Damrongsakkul, S., Tiptipakorn, S., & Takeichi, T. (2008). Biodegradability and property characterizations of Methyl Cellulose: Effect of nanocompositing and chemical crosslinking. *Carbohydrate Polymers*, 72(3), 444–455.
- Rodríguez, F. J., Galotto, M. J., Guarda, A., & Bruna, J. E. (2012). Modification of cellulose acetate films using nanofillers based on organoclays. *Journal of Food Engineering*, 110, 262–268.
- Rojas, M. C., & Brewer, M. S. (2008). Effect of Natural Antioxidants on Oxidative

- Stability of Frozen, Vacuum-Packaged Beef and Pork. *Journal of Food Quality*, 31(2), 173–188.
- Rosmini, M. R., Perlo, F., Pérez-Alvarez, J. A., Pagán-Moreno, M. J., Gago-Gago, A., López-Santoveña, F., & Aranda-Catalá, V. (1996). TBA test by an extractive method applied to “paté”. *Meat Science*, 42(1), 103–10.
- Rubilar, J. F., Cruz, R. M. S., Silva, H. D., Vicente, A. A., Khmelinskii, I., & Vieira, M. C. (2013). Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. *Journal of Food Engineering*, 115(4), 466–474.
- Ruiz-Hitzky, E., Darder, M., Fernandes, F. M., Wicklein, B., Alcântara, A. C. S., & Aranda, P. (2013). Fibrous clays based bionanocomposites. *Progress in Polymer Science*, 38(10–11), 1392–1414.
- Rusak, G., Komes, D., Likić, S., Horžić, D., & Kovač, M. (2008). Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110(4), 852–858.
- Sadeghi, G. M. M., & Mahsa, S. (2015). Compostable Polymers and Nanocomposites — A Big Chance for Planet Earth. In *Recycling Materials Based on Environmentally Friendly Techniques*. InTech.
- Sakurai, K. (2000). Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(N-vinyl pyrrolidone) blends. *Polymer*, 41(19), 7051–7056.
- Sanches-Silva, A., Costa, D., Albuquerque, T. G., Buonocore, G. G., Ramos, F., Castilho, M. C., Machado, A.V., & Costa, H. S. (2014). Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(3), 374–395.
- Sánchez-González, L., Chiralt, A., González-Martínez, C., & Cháfer, M. (2011). Effect of essential oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 105(2), 246–253.
- Sánchez-González, L., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Cháfer, M. (2010). Physical and antimicrobial properties of chitosan–tea tree essential oil

- composite films. *Journal of Food Engineering*, 98(4), 443–452.
- Santana, M. C. C. B., Machado, B. A. S., Silva, T. N., Nunes, I. L., & Druzian, J. I. (2013). Incorporação de urucum como aditivo antioxidante em embalagens biodegradáveis a base de quitosana. *Ciência Rural*, 43(3), 544–550.
- Santos, J. C. P., Sousa, R. C. S., Otoni, C. G., Moraes, A. R. F., Souza, V. G. L., Medeiros, E. A. A., Espitia, P. J. P., Pires, A. C. S., Coimbra, J. S. R., Soares, N. F. F. (2018). Nisin and other antimicrobial peptides: Production, mechanisms of action, and application in active food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 48, 179-194.
- Santos, R. D., Shetty, K., Cecchini, A. L., & Miglioranza, L. H. D. S. (2012). Phenolic compounds and total antioxidant activity determination in rosemary and oregano extracts and its use in cheese spread. *Semina: Ciências Agrárias*, 33(2), 655–666.
- Sanuja, S., Agalya, a., & Umapathy, M. J. (2014). Studies on magnesium oxide reinforced chitosan bionanocomposite incorporated with clove oil for active food packaging application. *International Journal of Polymeric Materials*, 63(14), 733–740.
- Sarantópoulos, C. G. L., Oliveira, L. M., Padula, M., Coltro, L., Aalves, R. M. V., & Garcia, E. C. (2002). *Embalagens plásticas flexíveis: Principais polímeros e avaliação de propriedades*. (CETEA/ITAL, Ed.). Campinas. 267p.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26(3), 246–65.
- Shariatnia, Z., & Fazli, M. (2015). Food Hydrocolloids Mechanical properties and antibacterial activities of novel nanobiocomposite films of chitosan and starch. *Food Hydrocolloids*, 46, 112–124.
- Sheard, P. R., Enser, M., Wood, J. D., Nute, G. R., Gill, B. P., & Richardson, R. I. (2000). Shelf life and quality of pork and pork products with raised n-3 PUFA. *Meat Science*, 55(2), 213–221.

- Shen, Z., Simon, G. P., & Cheng, Y.-B. (2002). Comparison of solution intercalation and melt intercalation of polymer–clay nanocomposites. *Polymer*, 43(15), 4251–4260.
- Silva-Weiss, A., Bifani, V., Ihl, M., Sobral, P. J. A., & Gómez-Guillén, M. C. (2013). Structural properties of films and rheology of film-forming solutions based on chitosan and chitosan-starch blend enriched with murta leaf extract. *Food Hydrocolloids*, 31(2), 458–466.
- Silva, A. S., Freire, J. M. C., García, R. S., Franz, R., & Losada, P. P. (2007). Time–temperature study of the kinetics of migration of DPBD from plastics into chocolate, chocolate spread and margarine. *Food Research International*, 40(6), 679–686.
- Silva, F., Domingues, F. C., & Nerín, C. (2018). Control microbial growth on fresh chicken meat using pinosylvin inclusion complexes based packaging absorbent pads. *LWT - Food Science and Technology*, 89(May 2017), 148–154.
- Silva, P. I., Stringheta, P. C., Teófilo, R. F., & de Oliveira, I. R. N. (2013). Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 538–544.
- Silvestre, C., Duraccio, D., & Cimmino, S. (2011). Food packaging based on polymer nanomaterials. *Progress in Polymer Science*, 36(12), 1766–1782.
- Singh, B., & Sharma, N. (2008). Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer Degradation and Stability*, 93(3), 561–584.
- Singh, G., Kapoor, I. P. S., Singh, P., Heluani, C. S., Lampasona, M. P., & Catalan, C. A. N. (2008). Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology*, 46(10), 3295–3302.
- Singh, P., Singh, S., Kapoor, I. P. S., Singh, G., Isidorov, V., & Szczepaniak, L. (2013). Chemical composition and antioxidant activities of essential oil and oleoresins from *Curcuma zedoaria* rhizomes, part-74. *Food Bioscience*, 3,

42–48.

- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu. *Methods in Enzymology*, 299(1999), 152–178.
- Siripatrawan, U., & Harte, B. R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24(8), 770–775.
- Siripatrawan, U., & Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 102–108.
- Siripatrawan, U., & Vitchayakitti, W. (2016). Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocolloids*, 61, 695–702.
- Sivasothy, Y., Chong, W. K., Hamid, A., Eldeen, I. M., Sulaiman, S. F., & Awang, K. (2011). Essential oils of *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and their antibacterial activities. *Food Chemistry*, 124(2), 514–517.
- Slavutsky, A. M., Bertuzzi, M. A., & Armada, M. (2012). Water barrier properties of starch-clay nanocomposite films. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15(3), 208–218.
- Soares, N. de F. F., Pires, A. C. S., Camilloto, G. P., Santiago-Silva, P., Espitia, P. J. P., & Silva, W. A. (2009). Recent patents on active packaging for food application. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 1(2), 171–178.
- Soares, N. F. F., & Hotchkiss, J. H. (1998). Naringinase immobilization in packaging films for reducing naringin concentration in grapefruit juice. *Journal of Food Science*, 63, 61–65.
- Souza, M. L., Morgado, C. M. A. ., Marque, K. M. ., Mattiuz, C. F. M., & Mattiuz, B. (2011). Pós-colheita de mangas “tommy atkins” recobertas com quitosana. *Rev. Bras. Fruticulturaev, especial*, 337–343.
- Souza, V. G. L., & Fernando, A. L. (2016). Nanoparticles in food packaging:

- Biodegradability and potential migration to food—A review. *Food Packaging and Shelf Life*, 8, 63–70.
- Souza, V. G. L., Fernando, A. L., Pires, J. R. A., Rodrigues, P. F., Lopes, A. A. S. S., & Fernandes, F. M. B. (2017). Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants. *Industrial Crops and Products*, 107(February), 565–572.
- Souza, V. G. L., Pires, J. R. A., Rodrigues, P. F., Lopes, A. A. S., Fernandes, F. M. B., Duarte, M. P., Coelho, I. M., & Fernando, A. L. (2018). Bionanocomposites of chitosan/montmorillonite incorporated with *Rosmarinus officinalis* essential oil: Development and physical characterization. *Food Packaging and Shelf Life*, 16(March), 148–156.
- Souza, V. G. L., Pires, J. R., Vieira, É., Coelho, I., Duarte, M., & Fernando, A. (2018). Shelf life assessment of fresh poultry meat packaged in novel bionanocomposite of chitosan/montmorillonite incorporated with ginger essential oil. *Coatings*, 8(5), 177.
- Souza, V. G. L., Ribeiro-Santos, R., Rodrigues, P. F., Otoni, C. G., Duarte, M. P., Coelho, I. M., Fernando, A. L. (2018). *Nanomaterial migration from composites into food matrices*. Em: Cirillo, G., Kozłowski, M. A., Spizzirri, U. G. (Eds.) *Composites Materials for Food Packaging*, Scrivener Publishing LLC, Wiley, 462 p., pp. 401–437.
- Souza, V. G. L., Rodrigues, P. F., Duarte, M. P., & Fernando, A. L. (2018). Antioxidant migration studies in chitosan films incorporated with plant extracts. *Journal of Renewable Materials*, in press.
- Souza, V. R., Pereira, P. A. P., Silva, T. L. T., Oliveira Lima, L. C., Pio, R., & Queiroz, F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156, 362–8.
- Sozer, N., & Kokini, J. L. (2009). Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in Biotechnology*, 27(2), 82–9.
- Spínola, V., Pinto, J., & Castilho, P. C. (2015). Identification and quantification of

- phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD–ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 173, 14–30.
- Sun, L., Sun, J., Chen, L., Niu, P., Yang, X., & Guo, Y. (2017). Preparation and characterization of chitosan film incorporated with thinned young apple polyphenols as an active packaging material. *Carbohydrate Polymers*, 163, 81–91.
- Tang, X. Z., Kumar, P., Alavi, S., & Sandeep, K. P. (2012). Recent advances in biopolymers and biopolymer-based nanocomposites for food packaging materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(5), 426–42.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Saraiva, J. A., & Nunes, M. L. (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, 43(1), 587–595.
- Tian, F., Decker, E. a, & Goddard, J. M. (2013). Controlling lipid oxidation of food by active packaging technologies. *Food & Function*, 4(5), 669.
- Tongnuanchan, P., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2013). Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils. *Journal of Food Engineering*, 117(3), 350–360.
- Trajano, V. N., Lima, O., Leite, E., & Travassos, R. (2009). Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos, 29(3), 542–545.
- Turkmen, N., Sari, F., & Velioglu, Y. S. (2006). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99(4), 835–841.
- Vallverdú-Queralt, A., Regueiro, J., Martínez-Huélamo, M., Rinaldi Alvarenga, J. F., Leal, L. N., & Lamuela-Raventos, R. M. (2014). A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary,

- thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chemistry*, 154, 299–307.
- Verlee, A., Mincke, S., & Stevens, C. V. (2017). Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 164, 268–283.
- Vieira, E., Souza, V. L., Pires, J., Duarte, M. P., Fernando, A. L. (2018). Antimicrobial activity of biopolymers incorporated with natural extracts. Em: Guiné, R., & Ferrão, A. C. (Eds.). *Book of abstract of 1st International Meeting on Innovation & Development in the Food Sector*, ISBN 978-989-96937-4-6, p.29-31.
- Vilarinho, F., Andrade, M., Buonocore, G. G., Stanzione, M., Vaz, M. F., & Sanches Silva, A. (2018). Monitoring lipid oxidation in a processed meat product packaged with nanocomposite poly(lactic acid) film. *European Polymer Journal*, 98(November), 362–367.
- Vince, J., & Hardesty, B. D. (2017). Plastic pollution challenges in marine and coastal environments: from local to global governance. *Restoration Ecology*, 25(1), 123–128.
- Viuda-Martos, M., & Pérez- Álvarez, J. A. Fernández-Lópes, J. (2014). Functional Antioxidant Foods. Em Bartosz, G. (Ed.), *Food Oxidants and Antioxidants Chemical, Biological, and Functional Properties* (p. 550). CRC Press.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., & Pérez-Álvarez, J. a. (2011). Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Research International*, 44(5), 1217–1223.
- Wang, H., Liu, H., Chu, C., She, Y., Jiang, S., Zhai, L., Jiang, S., & Li, X. (2015). Diffusion and antibacterial properties of nisin-loaded chitosan/poly (L-Lactic Acid) towards development of active food packaging film. *Food and Bioprocess Technology*, 8(8), 1657–1667.
- Wang, L., Dong, Y., Men, H., Tong, J., & Zhou, J. (2013). Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 35–41.

- Wang, S. F., Shen, L., Tong, Y. J., Chen, L., Phang, I. Y., Lim, P. Q., & Liu, T. X. (2005). Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: Preparation and characterization. *Polymer Degradation and Stability*, 90(1), 123–131.
- Wang, Y., Xia, Y., Zhang, P., Ye, L., Wu, L., & He, S. (2017). Physical characterization and pork packaging application of chitosan films incorporated with combined essential oils of cinnamon and ginger. *Food and Bioprocess Technology*, 10(3), 503–511.
- Warriss, P. D. (1999). *Meat science: an introductory text*. Wallingford: CABI.
- Wessling, C., Nielsen, T., & Giacini, J. R. (2001). Antioxidant ability of bht- and α -tocopherol impregnated LPDE film in packaging of oatmeal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(2), 194–201.
- Woranuch, S., & Yoksan, R. (2013). Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 96(2), 578–85.
- Worm, B., Lotze, H. K., Jubinville, I., Wilcox, C., & Jambeck, J. (2017). Plastic as a persistent marine pollutant. *Annual Review of Environment and Resources*, 42(1), null.
- Wu, J., Chen, S., Ge, S., Miao, J., Li, J., & Zhang, Q. (2013). Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 42–51.
- Wu, Y., Rhim, J. W., Weller, C. L., Hamouz, F., Cuppett, S., & Schnepf, M. (2000). Moisture loss and lipid oxidation for precooked beef patties stored in edible coatings and films. *Journal of Food Science*, 65(2), 300–304.
- Yang, F., Hu, S., Lu, Y., Yang, H., Zhao, Y., & Li, L. (2015). Effects of coatings of polyethyleneimine and thyme essential oil combined with chitosan on sliced fresh channa argus during refrigerated storage. *Journal of Food Process Engineering*, 38(3), 225–233.
- Youssef, A. M., El-sayed, S. M., El-sayed, H. S., Salama, H. H., & Dufresne, A. (2016). Enhancement of Egyptian soft white cheese shelf life using a novel

chitosan / carboxymethyl cellulose / zinc oxide bionanocomposite film. *Carbohydrate Polymers*, 151, 9–19.

Zainudin, M. A. M., Hamid, A. A., Anwar, F., Osman, A., & Saari, N. (2014). Variation of bioactive compounds and antioxidant activity of carambola (*Averrhoa carambola* L.) fruit at different ripening stages. *Scientia Horticulturae*, 172, 325–331.

Zamora, R., Delgado, R. M., & Hidalgo, F. J. (2014). Effects of Oxidation on the Nutritive and Health-Promoting Value of Food Components. Em Bartosz, G. (Ed.), *Food Oxidants and Antioxidants Chemical, Biological, and Functional Properties* (p. 550). CRC Press.

Zhang, L., & Kosaraju, S. L. (2007). Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. *European Polymer Journal*, 43(7), 2956–2966.